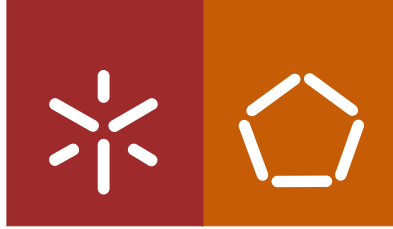


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Luísa Rodrigues Alves

**Estudo da bioactividade de
péptidos/proteínas para a
regeneração de tecidos.**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Ana Luísa Rodrigues Alves

**Estudo da bioactividade de
péptidos/proteínas para a
regeneração de tecidos.**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Micro/Nano Tecnologias

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Susana Moreira
e co-orientação do
Doutor Francisco Miguel Portela Gama

Outubro de 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Um trabalho não se pode fazer sem o esforço, apoio, a paciência e a compreensão de muitos a quem compete agradecer. Agradeço ao Prof. Doutor Miguel Gama por toda a confiança que depositou em mim e por toda a sua disponibilidade ao longo destes vários meses.

Agradeço à Susana Moreira, minha orientadora, por me fornecer conhecimento e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho, pela paciência e pelas horas concedidas.

Agradeço ainda o carinho, disponibilidade e prestabilidade dos colegas de laboratório Alexandre, João Pedro, Ned, Vera, Catarina, Reinaldo e Jorge.

Um especial agradecimento à minha amiga e colega de mestrado Catarina Nunes pela motivação e amizade que me dedicou durante todo este processo bem como à Ana Cristina, Daliana, Sílvia, Paula, Dina e Liliana, por todo o apoio técnico e emocional que me prestaram.

Agradeço a colaboração do Professor Augusto Faustino do ICBAS, que foi uma das pessoas mais importantes para a minha motivação e desenvolvimento crítico sobre o trabalho, a colaboração da Alexandra, da Dr.^a Luísa, do Prof. Doutor Manuel Vilanova e das técnicas do laboratório de patologia do ICBAS: Alexandra, Fátima e Célia.

O último agradecimento vai para os entes queridos, que toleraram as minhas frustrações e a minha ausência durante a realização deste trabalho e que me encorajaram a desafiar as dificuldades encontradas.

RESUMO

Estudo da bioactividade de péptidos/proteínas para a regeneração de tecidos

O principal objectivo da medicina regenerativa e engenharia de tecidos é restaurar a função de tecidos danificados. Por esta razão, o desenvolvimento de biomateriais nestas áreas pode contemplar a incorporação de proteínas para mimetizar comportamentos endógenos. Alguns dos péptidos/proteínas bioactivas que têm sido utilizados para facilitar a reparação e reconstrução duma variedade de tecidos, evitando a formação de cicatrizes, são as matriquinas e a eritropoetina (EPO). As matriquinas podem ser obtidas a partir da matriz extracelular (MEC), através da descelularização de tecidos ou órgãos, sendo que neste trabalho será utilizada a MEC do urotélio da bexiga de porco (UBM). As matriquinas têm demonstrado efeitos quimiotáticos e mitogénicos em células progenitoras/estaminais. Também a EPO para além da sua actividade na eritropoiese, revelou possuir actividade quimiotática para este tipo de células. Como tem sido demonstrada a participação de células estaminais na remodelação dos tecidos *in vivo*, torna-se interessante examinar a resposta das células indiferenciadas aos péptidos derivados da UBM. Assim, o objectivo deste trabalho recai sobre a avaliação da actividade quimiotática e mitogénica de matriquinas nas células progenitoras/estaminais através de estudos *in vitro* e da avaliação da reparação de feridas *in vivo*. Foi ainda testada a incorporação da EPO num nanogel de dextrino, uma vez que um sistema de libertação controlada da proteína pode trazer vantagens para posteriores aplicações *in vivo*.

Os resultados obtidos, embora preliminares, não confirmam o efeito na proliferação das células mesenquimais, ao contrário do esperado e do descrito na literatura. Por outro lado, nos ensaios de migração *in vitro* obtiveram-se resultados promissores, assim como nos estudos, *in vivo*, usando o modelo de feridas. Embora macroscopicamente não fossem visíveis diferenças nas feridas, a avaliação histológica sugere que nos animais tratados com o hidrolisado da UBM parece haver uma regeneração mais eficaz da pele lesada. No estudo de incorporação da EPO, os resultados sugerem que a proteína foi incorporada no nanogel de dextrino, sendo posteriormente libertada na presença de soro.

Os estudos efectuados reforçam a ideia de que as matriquinas promovem a migração de células estaminais *in vitro* e que o recrutamento, *in vivo*, deste tipo de células para o local da lesão poderá ser fundamental para a regeneração dos tecidos, evitando a formação de cicatriz. A incorporação da EPO no nanogel dextrino abre novas possibilidades de estudo para o desenvolvimento de um novo método terapêutico na medicina regenerativa.

ABSTRACT

Study of bioactivity of peptides / proteins for tissue regeneration

The main goal of regenerative medicine and tissue engineering is to restore the function of damaged tissues. For this reason, the development of biomaterials for these applications can include the incorporation of proteins to mimic endogenous behaviors. Some of the bioactive peptides/proteins that have been used to facilitate the repair and reconstruction of a variety of tissues, preventing scar formation, are the matrikines and the erythropoietin (EPO). The matrikines are obtained from the extracellular matrix (ECM) through decellularization of tissues or organs and, in this work, the ECM used was from pig's urinary bladder (UBM). The matrikines have shown chemotactic and mitogenic effects on progenitor/stem cells, as well as, EPO protein that beside its function on the red blood cells formation, it also showed chemotactic activity for MSCs. Since the participation of stem cells has been demonstrated in tissue remodeling *in vivo*, it is interesting to evaluate the response of undifferentiated cells to UBM's peptides. Thus, the aim of this work falls on the evaluation of the mitogenic and chemotactic activity of matrikines in progenitor/stem cells through *in vitro* studies and assessment of wound repair *in vivo*. The incorporation of an EPO into a dextrin nanogel was also tested, in order to develop a protein delivery system, which can provide benefits for future *in vivo* applications.

Preliminary the results do not confirm the effect on the proliferation of MSCs described in the literature. Nevertheless, promising results were obtained in the *in vitro* migration assays, as well as, in the *in vivo* wound regeneration studies. Although macroscopic differences were not detected, the histological evaluation suggests that the wounds of animals treated with UBM hydrolysates showed a more effective regeneration of damaged skin. Concerning of the EPO incorporation assays, the results suggest that EPO has been efficiently incorporated into dextrin nanogel, and its release was achieved in the presence of serum.

These studies support the idea that matrikines are important factors in stem cells migration *in vitro*, and that the recruitment of this type of cells *in vivo* to the injury site could promote the tissue regeneration, preventing scar formation. The use dextrin nanogel as delivery system for EPO opens new possibilities to the development of a new therapeutic method in regenerative medicine.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. Introdução	1
1.1 Medicina Regenerativa e Engenharia de tecidos.....	1
1.2 Nanotecnologia na medicina regenerativa	5
1.2.1 Sistemas de libertação controlada	7
1.2.2 Hidrogeis e nanogeis	8
1.2.3 Dextrino	11
1.3 Matriz extracelular e eritropoetina como agentes activos na regeneração de tecidos	13
1.3.1 Matriz extracelular	13
1.3.2 Eritropoetina	22
1.4 Objectivos.....	26
2. Materiais e métodos.....	28
2.1 Reagentes.....	28
2.2 Células e meio de cultura	28
2.3 Animais	28
2.4 Descelularização da MEC	29
2.5 Hidrólise enzimática da UBM	29
2.6 Fraccionamento do hidrolisado.....	30
2.7 Separação dos péptidos por electroforese	30
2.7.1 Análise de proteínas por SDS-PAGE (10%)	30
2.7.2 Análise de péptidos por electroforese SDS-PAGE Tris-Tricina (16,5%).....	32
2.8 Quantificação da proteína total.....	33
2.9 Recolha das células estaminais mesenquimais de rato (MSCr)	33
2.10 Avaliação da bioactividade das amostras e fracções da UBM	34
2.10.1 Ensaio de proliferação celular.....	34

2.10.2 Ensaio de migração celular	35
2.11 Ensaios <i>in vivo</i> utilizando modelo de feridas em pele de ratos Balb/c	36
2.11.1 Análise histologia das feridas	36
2.12 Ensaios de incorporação da EPO no nanogel de dextrino	37
3. Resultados e Discussão	39
3.1 Caracterização dos produtos da hidrólise da UBM	39
3.2 Avaliação da actividade mitogénica e quimiotática dos produtos derivados da hidrólise da UBM	42
3.3 Avaliação da capacidade regenerativa dos produtos resultantes da digestão da UBM <i>in vivo</i>	49
3.4 Incorporação da eritropoetina no nanogel de dextrino	53
4. Conclusão e trabalhos futuros	55
5. Bibliografia	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação esquemática da abordagem da engenharia de tecidos para a regeneração de tecidos: 1. Colheita de células de uma fonte humana ou animal e expansão <i>in vitro</i> ; 2. As células são semeadas em <i>scaffolds</i> que podem incorporar biomoléculas; 3. Inserção do <i>scaffold</i> e das células no local lesado; 4. As células diferenciam-se e formam novo tecido (Shekaran e Garcia, 2011).....	3
Figura 1.2 Representação esquemática da migração/ <i>homing</i> das células estaminais (Chen <i>et al.</i> ,2011).....	5
Figura 1.3 Inchamento de hidrogéis em resposta a estímulos (Gupta <i>et al.</i> , 2002).	9
Figura 3.1 Imagem de gel SDS-PAGE a 10%, em que A representa a UBM antes da digestão enzimática e B representa a UBM depois da digestão.	40
Figura 3.2 Imagem de gel Tris-tricina a 16,5%, em que A corresponde ao marcador de PM, B ao hidrolisado e C à amostra com PM <30 kDa.....	41
Figura 3.3 Imagem de gel Tris-tricina a 16,5%, em que A representa o hidrolisado, B representa a fracção solúvel e C representa a amostra com PM >30 kDa.....	41
Figura 3.4 Proliferação das MSCr tratadas com o hidrolisado, com a fracção PM > 30 kDa e com a fracção PM <30 kDa, ao longo de 72 h. A concentração de proteína total dissolvida em todas as fracções é 100 µL/mL. As respostas proliferativas foram avaliadas através do MTT.	45
Figura 3.5 Proliferação dos fibroblastos tratados com: a fracção solúvel do hidrolisado, a fracção PM > 30 kDa e a fracção PM <30 kDa, ao longo de 72 h. A concentração de proteína total dissolvida em todas as fracções é 100 µL/mL. As respostas proliferativas foram avaliadas utilizando MTT.	46

Figura 3.6 Resposta proliferativa das MSCr, ao longo de 72 h, na presença do hidrolisado de UBM com diferentes concentrações de proteína total dissolvida. As respostas proliferativas foram avaliadas através do ensaio MTT	47
Figura 3.7 Resposta proliferativa das MSCr, ao longo de 72 h, na presença do hidrolisado de UBM com diferentes concentrações de proteína total dissolvida. As respostas proliferativas foram avaliadas através do ensaio MTT	47
Figura 3.8 Fotografias tiradas às feridas dos animais 8 (A, D), 15 (B, E.) e 18 (C, F) dias após o início do ensaio. Os animais A, B e C pertencem ao grupo que recebeu como tratamento o hidrolisado e os animais D, E e F, ao grupo que recebeu como tratamento a fracção solúvel do hidrolisado. As feridas do lado direito do animal foram tratadas com as amostras e as do lado esquerdo receberam PBS (controlo).....	51
Figura 3.9 Análise histológica das feridas de ratos sacrificados ao décimo oitavo dia após o início do ensaio (ampliação 4x). Feridas tratadas com hidrolisado (A), fracção solúvel do hidrolisado (B) ou PBS (C). Os limites da ferida estão indicados com a cabeça de seta branca. As feridas que receberam o hidrolisado e a fracção solúvel do hidrolisado aumentaram o número de glândulas sebáceas (*) e folículos (**), apresentando uma derme e epiderme melhor desenvolvidas do que as feridas controlo, com hiperplasia comum (***) em tecido de granulação (****), onde se aplicou apenas PBS.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Exemplo de nanopartículas e suas aplicações biomédicas (adaptado de Engel <i>et al.</i> , 2007).	6
Tabela 1.2 Matriquinas derivadas do colagénio (adaptado de Schank e Quaranta 2003).	18
Tabela 1.3 Lista com exemplos de <i>scaffolds</i> de matriz extracelular comercialmente disponíveis (Badylak, 2007).	20
Tabela 1.4 Potencial terapêutico e aspectos negativos da EPO (adaptado de Maiese <i>et al.</i> , 2008).	24
Tabela 2.1 Composição dos géis concentrador (4%) e resolvente (10%) para análise das amostras hidrolisadas por SDS PAGE.	31
Tabela 2.2 Composição do gel resolvente 16,5% de Tris-Tricina.	32
Tabela 3.1 Resultados obtidos nos ensaios de migração utilizando o sistema BD <i>BioCoat™ Growth Factor Reduced Matrigel™ Invasion Chamber</i>	43
Tabela 3.2 Resultados obtidos no ensaio de incorporação da EPO no nanogel de dextrino. Estão representadas as D.O. obtidas com as concentrações de EPO equivalentes às D.O.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	Factor de crescimento fibroblástico básico
BSA	Albumina sérica bovina
DAPI	4', 6 - diamidino - 2 - fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's mediam</i>
DO	Densidade óptica
EGF	Factor de crescimento epidérmico
EPO	Eritropoetina
EPOR	Receptor da eritropoetina
FBS	Soro bovino fetal
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FGF	Factor de crescimento de fibroblastos
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
MSCh	Células mesenquimais humanas
MSCr	Células mesenquimais de rato
NG	Nanogel
NPs	Nanopartículas
PE	Penicilina/estreptomicina
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amónio
RGD	Arg-Gly-Asp
PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas

SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cystein</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina
TGF- β	Factor beta de transformação do crescimento
VEGF	Factor de crescimento do endotélio vascular
UBM	Matriz extracelular do urotélio da bexiga de porco
3D	Tri-dimensional

1. Introdução

1.1 Medicina Regenerativa e Engenharia de tecidos

A medicina regenerativa é uma área multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos das ciências da vida, medicina e engenharia, para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, manter e melhorar as funções do corpo tendo como ferramentas principais as células e materiais (Polak, 2009). Esta área surgiu da necessidade de reconstrução de tecidos comprometidos pela idade, doença, trauma e anomalias congénitas (Vacanti, 2010). Tem como objectivo a auto-regeneração de tecidos danificados ou órgãos, estimulando os mecanismos de cura do próprio organismo (Maienschein, 2011). Esta abordagem traz grandes expectativas para o tratamento de um grande número de doenças, como o Parkinson, Alzheimer, osteoporose, lesões na coluna e cancro, que poderão num futuro próximo ser tratadas com métodos que visam a regeneração dos tecidos (Engel *et al.*, 2007). A regeneração é o processo pelo qual os tecidos lesados são restaurados para a sua estrutura e função original. Contudo, nos mamíferos a resposta para a cura na maioria dos tecidos é marcada pela proliferação de fibroblastos e deposição de tecido cicatricial. Apesar do grande progresso alcançado na compreensão das bases moleculares da reparação e regeneração de tecidos em vários modelos, a tendência dos mamíferos para uma cura imperfeita e formação de cicatrizes ao invés da regeneração permanece sem explicação. Embora a cicatrização contribua para o restauro e ofereça um suporte estrutural e funcional parcial, o resultado final da formação da cicatriz pode ser mais nocivo do que a lesão inicial. Isto é especialmente verdade no caso do coração, que é sensível às heterogeneidades eléctricas e às propriedades mecânicas alteradas produzidas pela cicatrização. Também a dificuldade em curar úlceras de pele associadas com a diabetes *mellitus* e a cicatrização excessiva representam graves problemas clínicos e socioeconómicos (Palatinus *et al.*, 2010; Eming *et al.*, 2009).

Um traumatismo num tecido inicia uma série de acontecimentos que requer um equilíbrio delicado entre a reparação do tecido e a função em curso. Os mamíferos não

têm a capacidade de restaurar os tecidos e órgãos para a sua estrutura e função original, a regeneração total acontece apenas no útero. Nos mamíferos adultos, o processo de cura é menos restaurador devido à infiltração de células inflamatórias do sangue e à expressão diferencial de moléculas de sinalização que conduzem à produção da cicatriz. A reparação e posterior cicatrização não ocorrem com a mesma intensidade em todos os tecidos, devido a diferenças nas propriedades intrínsecas dos tipos celulares envolvidos, da matriz extracelular (MEC), das citocinas de sinalização e do stress mecânico à volta da lesão (Palatinus *et al.*, 2010).

A engenharia de tecidos integra um campo mais amplo da medicina regenerativa tendo como objectivo a reconstrução da função de tecidos danificados (Kim *et al.*, 2011). As estratégias para atingir este objectivo, *in vitro* e *in vivo*, geralmente incluem: 1) moléculas de sinalização, a maioria factores de crescimento que tentam reproduzir a sequência natural de sinais que orientam a reparação espontânea de tecidos; 2) células, no caso do tecido não ser capaz de se auto-regenerar; e 3) se necessário, o desenvolvimento de biomateriais baseados em estruturas tri-dimensionais (3D) – *scaffolds* - que providenciam um suporte mecânico ao desenvolvimento de novo tecido, mimetizando funções biológicas (Liao *et al.*, 2008; Quaglia, 2008; Feil *et al.*, 2011). A combinação de células, factores de crescimento e de um *scaffold* permite a adesão, organização e desenvolvimento celular de forma semelhante ao tecido nativo (Shekaran e Garcia, 2011). A figura 1.1 resume a abordagem utilizada na engenharia de tecidos para a regeneração de tecidos.

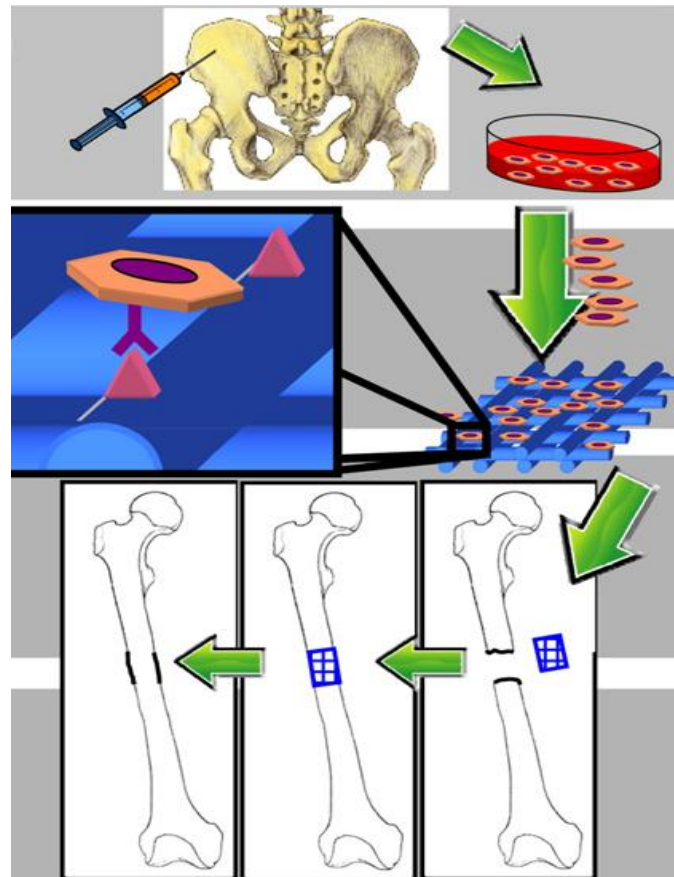


Figura 1.1 Representação esquemática da abordagem da engenharia de tecidos para a regeneração de tecidos: 1. Colheita de células de uma fonte humana ou animal e expansão *in vitro*; 2. As células são semeadas em *scaffolds* que podem incorporar biomoléculas; 3. Inserção do *scaffold* e das células no local lesado; 4. As células diferenciam-se e formam novo tecido (Shekaran e Garcia, 2011-).

O principal desafio da engenharia de tecidos e medicina regenerativa é desenvolver alternativas ao transplante de órgãos e tecidos de modo a ultrapassar as limitações que estas metodologias apresentam, como por exemplo a disponibilidade limitada dos mesmos e questões associadas à transmissão de doenças e imunogenicidade (Chen e Mooney, 2003). A terapia baseada em células é uma das técnicas melhor documentada na medicina regenerativa. Contudo, como o número de células dadoras é limitado e o procedimento é dispendioso e demorado, alguns autores defendem como alternativa a regeneração de tecidos através do controlo dos mecanismos de regeneração natural com base no recrutamento de células estaminais do próprio organismo (Yang *et al.*, 2005). A descoberta de que as células estaminais/progenitoras residem numa infinidade de tecidos/órgãos (por exemplo: na medula óssea, tecido adiposo, músculo esquelético) e que também circulam no sangue veio ao encontro das teorias sobre a presença de populações de células regenerativas em

organismos desenvolvidos. Este facto levou a um crescente interesse no uso destas células como terapêutica (Chen *et al.*, 2011). A medula óssea, num estado estacionário desempenha um papel fundamental na manutenção de nichos de células estaminais, mantendo um equilíbrio dinâmico em que um pequeno número de células saem constantemente da medula óssea, entram nos tecidos e voltam para a mesma ou para nichos periféricos de tecidos específicos (Krankel *et al.*, 2011). A medula óssea contém vários tipos de células estaminais como é o caso das *mesenchymal stem cells* (MSC). As MSC são capazes de auto-renovação e de se diferenciarem em queratinócitos, células endoteliais, pericitos e sebócitos (Mitsiadis *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006). Manifestam propriedades imunomoduladoras e apresentam baixa imunogenicidade, que são características importantes para terapias baseadas em células (Hocking e Gibran, 2010). A informação actual sugere que a contribuição da diferenciação das MSC é limitada devido ao pouco número e à fraca sobrevivência destas células no local da lesão. No campo da biologia das células estaminais, surge o termo “*homing*” que se refere à capacidade de uma célula estaminal encontrar o caminho para um destino anatómico específico, muitas vezes a grandes distâncias, através da corrente sanguínea. Na verdade, o *homing* é necessário para todas as terapias baseadas em células estaminais, independentemente da célula ser endógena ou artificialmente administrada (Dominici *et al.*, 2009). Por exemplo, em resposta a uma lesão cutânea, as células endógenas da medula óssea são mobilizadas e recrutadas para a ferida contribuindo com células inflamatórias, células progenitoras endoteliais e fibroцитos (Hocking e Gibran, 2010). Os mecanismos e os sinais que levam as MSC para as feridas não são totalmente compreendidos. É provável que envolva a interacção complexa de moléculas de adesão, quimiocinas, receptores de quimiocinas e proteases da matriz extracelular (Hocking e Gibran, 2010). Esta mobilização das MSC em resposta a uma lesão está correlacionada com o aumento das concentrações de citocinas, do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e factor estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF) no sangue periférico que acontece após uma lesão. O processo *homing* envolve a retenção das MSC dentro da vasculatura e migração transendotelial seguido por quimiotaxia para o tecido lesado, como demonstrado na figura 1.2 (Mauney *et al.*, 2010). Outro modo de migração ou de *homing* é conhecido como migração intersticial ou movimento amebóide activo, que dita que as células estaminais reconheçam e obedeçam a sinais extravasculares que ocorrem de uma forma independente do fluxo de sangue (Chen *et al.*, 2011).

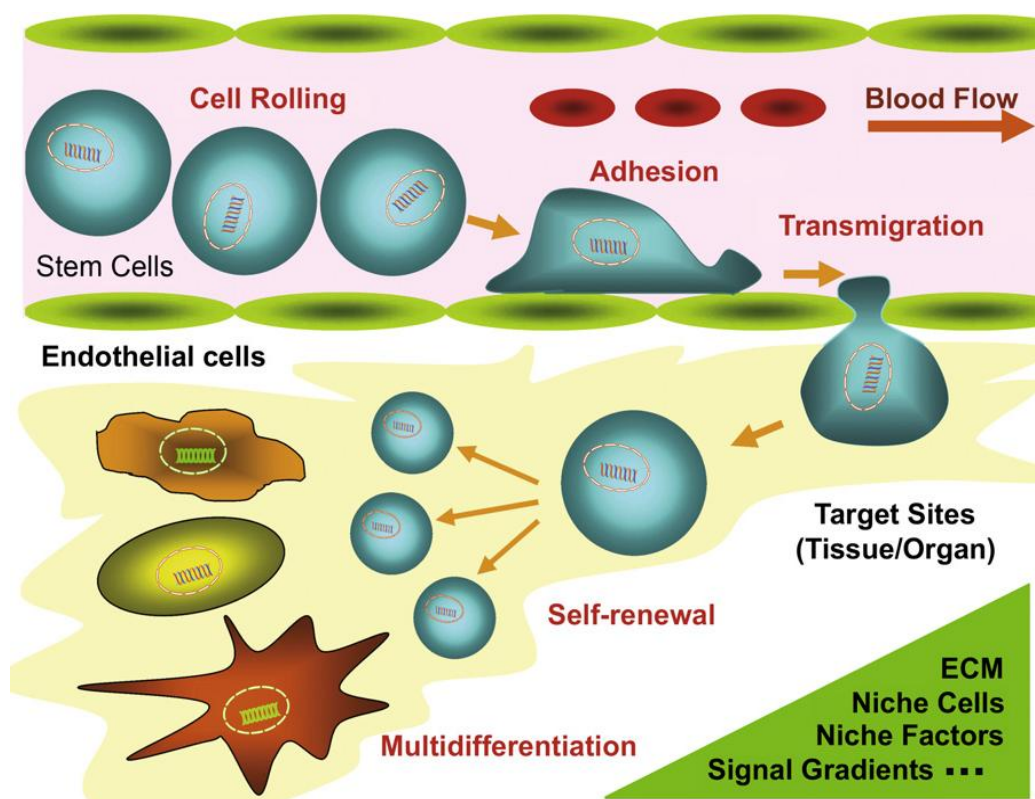


Figura 1.2 Representação esquemática da migração/*homing* das células estaminais (Chen *et al.*, 2011).

Assim, os materiais utilizados para aplicações nesta área devem ser desenhados para estimular respostas celulares específicas a nível molecular (Cunha *et al.*, 2011).

1.2 Nanotecnologia na medicina regenerativa

In vivo, as células encontram-se localizadas num microambiente 3D, onde estão rodeadas por outras células e pela MEC. Torna-se, assim, essencial o desenvolvimento de *scaffolds* que recriem um microambiente, proporcionando um suporte 3D, para controlar o comportamento celular e promover interações específicas entre as células. As subunidades básicas funcionais das células e tecidos são definidas à nanoescala, por isso, a compreensão da nanobiologia e a aplicação da nanotecnologia representa uma nova fronteira na pesquisa da engenharia de tecidos e medicina regenerativa. A nanotecnologia permite o desenvolvimento de novos sistemas que conseguem mimetizar a estrutura complexa do tecido nativo. Assim, combinada com a biologia

poderá resolver vários problemas biomédicos e revolucionar as metodologias usadas na medicina. A nanotecnologia para além de produzir nanoestruturas capazes de mimetizar as biológicas, também acarreta a promessa do fornecimento de sistemas de libertação eficientes. Existe um interesse crescente na nanomedicina, já que a aplicação de ferramentas da nanotecnologia para o desenvolvimento de estruturas com propriedades controladas a nível molecular poderá melhorar as interações entre as superfícies dos materiais e as entidades biológicas. Muitos componentes biológicos apresentam dimensões nano e, portanto, há interesse no uso de nanomateriais. Os nanomateriais utilizados em aplicações biomédicas incluem nanopartículas, por exemplo para a libertação de moléculas (fármacos, factores de crescimento, DNA), nanofibras para *scaffolds* de tecidos; e nanodispositivos como biosensores (Engel *et al.*, 2007, Armentano *et al.*, 2010, Cunha *et al.*, 2011). Na tabela 1.1 encontram-se alguns tipos de nanopartículas e as suas aplicações biomédicas.

Tabela 1.1 Exemplo de nanopartículas e suas aplicações biomédicas (adaptado de Engel *et al.*, 2007).

Nanopartículas	Aplicações
Nanopartículas de titânio	Reforça materiais compósitos em <i>scaffolds</i> usado na Engenharia de tecidos
<i>Quantum Dots</i>	Amplificadores, marcadores, sensores biológicos para biorreactores e Engenharia de tecidos
Nanopartículas de hidroxiapatite	Reforça materiais compósitos usados na Engenharia de tecidos e transporte de biomoléculas.
Nanopartículas poliméricas biodegradáveis	Libertação controlada na Engenharia de tecidos e imunoterapia.
Nanopartículas poliméricas sensíveis a estímulos	Transporte de biomoléculas, usadas também na Engenharia de tecidos.

1.2.1 Sistemas de libertação controlada

Os sistemas de libertação controlada são entendidos como sistemas capazes de libertar um agente activo, num local específico, a uma taxa específica durante um determinado período de tempo. São baseados no conhecimento interdisciplinar que combina a ciência de polímeros, farmacêutica, química e a biologia molecular.

Nos sistemas de libertação controlada há que ter em conta vários factores que têm de estar em concordância com o local onde vai ser libertado o agente incorporado, a via por onde vai ser administrado, o material que é usado, a taxa de degradação do material, as propriedades químicas e físicas, entre outros parâmetros (Reis *et al.*, 2002). No design e fabricação de sistemas de libertação controlada já foram utilizadas diferentes geometrias e configurações (microsféricas, cápsulas, membranas, etc), bem como uma diversidade de materiais, desde polímeros sintéticos e naturais que podem ser degradáveis (Baldwin *et al.*, 1998).

Pretende-se facilitar a dosagem e a duração do efeito da substância no organismo, causando danos mínimos ao paciente, permitindo a redução da frequência de dosagem e aumentando a eficiência da mesma (Reis *et al.*, 2002). No caso particular das terapias baseadas em proteínas, o desenvolvimento de nanomateriais para a sua veiculação e libertação controlada têm especial importância, uma vez que a sua utilização na medicina tem sido limitado devido à sua baixa disponibilidade a qual resulta da sua estabilidade reduzida frente às proteases e à degradação hidrolítica, à baixa permeabilidade e aos tempos reduzidos de semi-vida na circulação sistémica, quando administrados por via intravenosa, intramuscular ou subcutânea. Por estes motivos são administradas em altas concentrações ou em doses frequentes, o que pode resultar em vários efeitos secundários (Reis *et al.*, 2006).

As propriedades adicionais que podem ser incluídas nos sistemas nano de forma a melhorar a biodisponibilidade da substância activa no local danificado, e especialmente a internalização celular são muito importantes. Um sistema

nanotransportador que é incorporado com propriedades estímulo-resposta, por exemplo, seria favorável para abordar algumas barreiras de libertação sistêmica e intracelular (Motornov *et al.*, 2010).

1.2.2 Hidrogeis e nanogeis

Hidrogeis são *networks* poliméricas, altamente hidrofílicas que conseguem reter uma quantidade significativa de água ou fluidos biológicos sem se dissolverem (Kopecek e Yang, 2009). Do ponto de vista biológico, esta é uma propriedade essencial para a imunotolerância. Devido ao elevado teor em água, os hidrogeis possuem um grau de flexibilidade muito semelhante ao tecido natural, o que minimiza potenciais irritações nas membranas e nos tecidos circundantes (Byrne *et al.*, 2002). Estas propriedades mostram o grande potencial dos hidrogeis na medicina regenerativa, engenharia de tecidos, no transporte de fármacos e na bionanotecnologia (Bencherif *et al.*, 2009). Dependendo das suas reticulações, os hidrogeis podem ser classificados de químicos (ligações covalentes) ou físicos (Kopecek e Yang, 2009). A degradação dos hidrogeis, e a consequente libertação do agente activo, pode ser feita por via enzimática ou hidrolítica, por estímulos provenientes do meio onde se encontram, como o pH e a temperatura (Hoare e Kohane, 2008). Alguns dos estímulos que têm sido explorados para a modulação de mecanismos de libertação de agentes activos são apresentados na figura 1.3 (Gupta *et al.*, 2002).

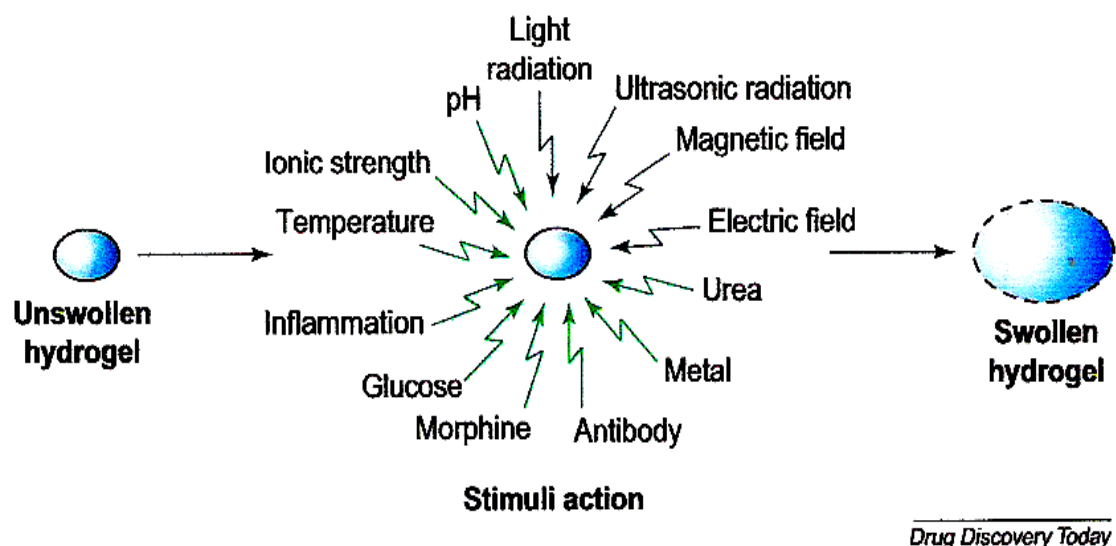


Figura 1.3 Inchamento de hidrogéis em resposta a estímulos.

A estrutura altamente porosa do hidrogel pode facilmente ser ajustada pelo controlo da densidade das reticulações na matriz do gel, bem como a afinidade dos hidrogéis para o meio aquoso onde vão inchar. A porosidade, também permite o carregamento de agentes activos na matriz e posterior libertação dos mesmos a uma taxa dependente do coeficiente de difusão das moléculas pequenas ou macromoléculas, através da rede do gel.

Apesar das muitas vantagens, os hidrogéis apresentam algumas limitações, entre elas a reduzida força de tensão, que pode resultar na dissolução prematura quando usado em aplicações com carga, fazendo com que o fármaco/agente bioactivo seja libertado longe do local alvo. O maior problema prende-se com as propriedades dos hidrogéis relativas ao transporte do agente activo, já que a quantidade e a homogeneidade no carregamento das substâncias podem ser limitadas, em particular no caso de substâncias hidrofóbicas. O alto teor em água e o grande tamanho dos poros, muitas vezes resultam numa libertação relativamente rápida. Embora muitos hidrogéis tenham a capacidade de deformação para serem injectados, outros não possuem esta capacidade necessitando de implante cirúrgico (Hoare e Kohane, 2008).

Os hidrogéis podem apresentar uma forma macroscópica ou podem estar confinados a dimensões pequenas como microgeis ou nanogeis. Os hidrogéis com tamanho submicron têm atraído grande interesse devido ao seu tamanho e às propriedades únicas de superfície que permitem mais reacções químicas e bioconjugações polivalentes. Além disso, os nanogeis ou nanopartículas de hidrogel conseguem reter fármacos e biomoléculas, agentes activos hidrofóbicos ou hidrofílicos, e, conseqüentemente, podem ser muito úteis no transporte de proteínas e genes (Bencherif *et al.*, 2009). As substâncias podem-se encontrar dissolvidas, recobertas, encapsuladas ou dispersas nas nanopartículas (Teixeira *et al.*, 2005). De acordo com as características estruturais, os nanogeis são preparados essencialmente por ligações covalentes, iónicas, complexação polielectrólito e por *self-assembly*.

Moléculas anfifílicas formam agregados por *self-assembly*, como por exemplo micelas. Esta propriedade dos biopolímeros é um dos factores mais importantes para a sua auto-organização em água. Entre os diferentes tipos de polímeros anfifílicos, os polímeros solúveis em água com moléculas hidrofóbicas enxertadas têm recebido uma atenção especial. Através do *self-assembly*, é formado um núcleo hidrofóbico cercado por cadeias hidrofílicas, sendo estas estruturas adequadas para reter substâncias hidrofóbicas. As nanoestruturas formam-se espontaneamente quando a concentração do polímero é maior do que a sua concentração micelar crítica (cmc) (Gonçalves *et al.*, 2007).

As vantagens da utilização dos nanogeis incluem: 1) a libertação controlada e / ou prolongada da substância encapsulada; 2) a redução dos efeitos secundários associados à substância; 3) a protecção dos compostos da inactivação antes de atingirem o local de acção; 4) o aumento da actividade farmacológica; 5) a capacidade de atingir vasos sanguíneos de menor dimensão e penetração nos tecidos por via transcelular ou paracelular. Para além destas vantagens, o carregamento de substâncias é relativamente eficiente e pode ser feito sem recorrer a reacções químicas, para além disso, o tamanho das partículas, bem como as suas propriedades de superfície, podem ser manipuladas para evitar a eliminação por células fagocíticas, permitindo que a substância carregada atinja o alvo de forma passiva ou activa. Potencialmente os nanogeis podem ser administrados através de várias vias incluindo a oral, nasal, pulmonar, parental intra-

ocular, etc – o que também constitui uma vantagem (Teixeira *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2007).

1.2.3 Dextrino

A engenharia de polímeros tem sido utilizada no desenvolvimento de sistemas avançados para libertação controlada. Os polímeros são materiais que apresentam grande variedade de estruturas e propriedades, estando disponíveis em diferentes composições (Kim *et al.*, 2009). Quer os polímeros sintéticos quer os naturais têm sido explorados como transportadores de fármacos e como *scaffolds* na engenharia de tecidos. Na maioria dos casos são utilizados os polímeros sintéticos e não degradáveis (Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001), que, geralmente, são biologicamente inertes e apresentam propriedades mais previsíveis (Rieux *et al.*, 2006). Os polímeros naturais possuem várias propriedades que os tornam atractivos em diversas aplicações biomédicas. No entanto, podem induzir respostas imunológicas e inflamatórias devido a factores indefinidos e patogénicos, que não são possíveis de eliminar completamente. Além do mais, estes polímeros são menos susceptíveis a modificações, quando comparados com os sintéticos, que são mais baratos e mais facilmente caracterizados. Os sistemas de libertação de péptidos e proteínas são preparados, geralmente, a partir de polímeros biodegradáveis. No entanto, o desenvolvimento de sistemas biodegradáveis requer o controle de um maior número de variáveis, já que a cinética de degradação do polímero, *in vivo*, deve permanecer constante para que seja obtida uma libertação controlada da substância (Dash e Cudworth, 1998). Apesar das vantagens dos polímeros sintéticos, estes não têm reconhecimento celular, originando assim, poucas interacções celulares (Cunha *et al.*, 2011).

Os principais critérios na selecção de um polímero são a biodisponibilidade, a biocompatibilidade e a velocidade de degradação. O processo de biodegradação envolve a clivagem hidrolítica ou enzimática levando à erosão do material (Nair e Laurencin, 2007).

O dextrino é um polímero natural usado como transportador biodegradável de fármacos e autorizado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) em humanos. O dextrino é um polímero composto por unidades de glicose ligadas por ligações $\alpha(1-4)$, é biocompatível e degradado pela α -amilase. Contém poucas ramificações, com menos de 5% de ligações $\alpha-1,6$. A sua estrutura encontra-se representada na figura 1.3 (Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001).

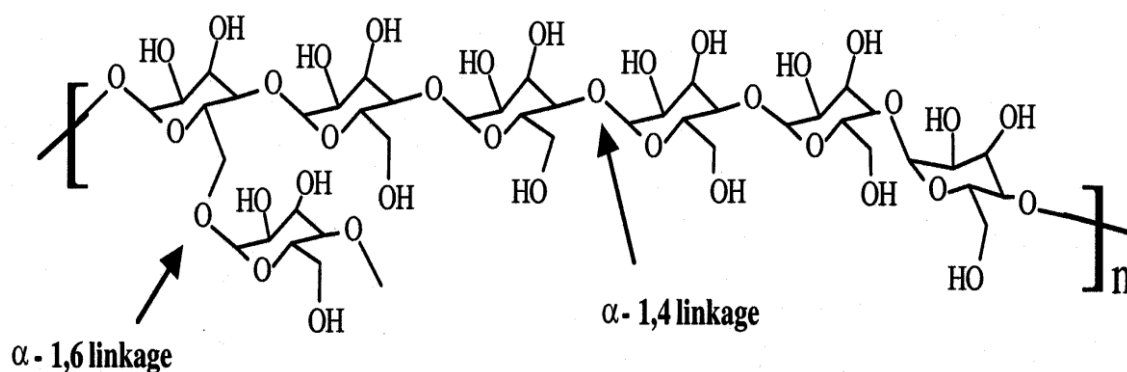


Figura 1.3 Representação esquemática da estrutura molecular do dextrino.

Recentemente, foi desenvolvido e caracterizado um nanogel obtido por *self-assembly* de dextrino hidrofobizado (Gonçalves *et al.*, 2007, Gonçalves e Gama, 2008). O dextrino foi modificado com cadeias alquílicas longas, obtendo-se assim uma molécula anfifílica, que origina duas populações distintas, uma com 25 nm (a mais predominante) e outra com 150 nm, ambas com forma esférica. Estudos *in vitro* confirmaram a não toxicidade do dextrino e a falta de resposta reactiva a macrófagos (Gonçalves *et al.*, 2009). Num estudo realizado por Carvalho e seus colaboradores, ficou demonstrado que a encapsulação da interleucina-10 (IL-10) no nanogel de dextrino protege esta proteína da desnaturação a 37°C, aumentando portanto a estabilidade da proteína, e permite também a sua libertação em quantidades biologicamente significativas ao longo do tempo (Carvalho *et al.*, 2010). Assim, este será um sistema promissor em aplicações médicas, utilizado como sistema de libertação controlada.

1.3 Matriz extracelular e eritropoetina como agentes activos na regeneração de tecidos

Os produtos de degradação da MEC (Li *et al.*, 2004; Badylak *et al.*, 2001; Vorotnikova *et al.*, 2010) e a eritropoetina (EPO) (Bader, 2010) provaram ter capacidades quimiotáticas para células progenitoras e estaminais e mostram contribuir para uma reparação acelerada em tecidos danificados. As funções, características e propriedades da MEC e da EPO serão descritas nos próximos itens para uma melhor compreensão do seu potencial para a regeneração de tecidos e para a utilização das mesmas em aplicações terapêuticas na medicina regenerativa e engenharia de tecidos.

1.3.1 Matriz extracelular

Durante muito tempo a MEC foi considerada uma estrutura de suporte para as células do tecido conectivo. Dados recentes, contudo, indicam que a MEC é de facto o componente principal para a regulação da actividade celular (Marquart *et al.*, 2005). É desenhada e fabricada de forma personalizada pelas células de cada tipo de tecido e órgão, encontrando-se num estado de equilíbrio dinâmico com o micro-ambiente em redor. As moléculas estruturais e funcionais da MEC fornecem os meios pelos quais cada célula adjacente comunica com outras e com o ambiente externo (Badylak, 2007).

1.3.1.1 Estrutura e função da matriz extracelular

A MEC é uma mistura complexa de proteínas (como colagénios, elastina), glicoproteínas (como laminina, fibronectina e vitronectina), proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs), servindo de reservatório natural dos factores de crescimento e de outras moléculas de sinalização (Adair-Kirk e Senior, 2008; Badylak, 2007). A composição, imobilização e arranjo espacial varia para cada tipo de tecido. Estas diferenças na composição podem ser esclarecedoras para a engenharia de tecidos porque diferentes macromoléculas da MEC regulam o crescimento e diferenciação

celular estimulando selectivamente vias de sinalização através das interacções da MEC com vários receptores celulares (Shekaran e Garcia, 2011).

A MEC afecta a adesão, a forma, a migração, a proliferação e a diferenciação celular e os seus componentes interagem com receptores específicos na superfície das células como por exemplo as integrinas (Adair-Kirk e Senior, 2008). As integrinas são receptores transmembranares na superfície das células, sendo os principais intervenientes na transmissão de sinais mecânicos e químicos da MEC. Estas interacções MEC - integrinas determinam a sobrevivência, o crescimento, a migração e a diferenciação celular, sendo assim úteis em estratégias biomiméticas na engenharia de tecidos (Shekaran e Garcia, 2011).

1.3.1.2 Degradação e remodelação da matriz extracelular

As interacções entre a MEC e receptores de superfície celular nem sempre são via integrinas e, por vezes, ocorrem apenas quando as moléculas da MEC sofrem alterações (Davis *et al.*, 2000). A MEC encontra-se num estado contínuo de remodelação que é catalisada por enzimas de degradação como as metaloproteinases (MMP). A remodelação da MEC está envolvida na sobrevivência, migração e proliferação de muitos tipos de células e tem sido implicada na resposta à reparação de feridas (Vorotnikova *et al.*, 2010). Quando ocorre dano num tecido, a composição da MEC e os seus locais de reconhecimento são alterados de várias formas: verifica-se um aumento da permeabilidade vascular, que resulta no recrutamento de proteínas derivadas do plasma (como fibronectina, vitronectina e fibrinogenio) para dentro da MEC, enquanto as células no local lesado são induzidas a libertar ou sintetizar novos componentes da MEC, como por exemplo, a SPARC (*secreted protein acidic and rich in cystein*), a trombospondina e a tenascina, que regulam a reparação do tecido. Além disso, as lesões em tecidos resultam em alterações nas proteínas existentes da MEC dentro dos tecidos ou em (*matri*)*cryptic sites*, biologicamente activos que providenciam sinais importantes para a regulação do processo de reparação (Davis *et al.*, 2000). Contudo, os mecanismos específicos da degradação da MEC *in vivo* continuam desconhecidos (Li *et al.*, 2004). Estudos realizados mostram que métodos não

fisiológicos de degradação da MEC através da temperatura e/ou tratamentos enzimáticos podem produzir moléculas de baixo peso molecular, que retêm a bioactividade e podem afectar a angiogênese (Li *et al.*, 2004), migração celular (Li *et al.*, 2004, Reing *et al.*, 2009), proliferação (Reing *et al.*, 2009), e possui actividade antimicrobiana (Brennan *et al.*, 2006; Voytik-Harbin *et al.*, 1997; Hodde *et al.*, 2001; Hodde *et al.*, 2005; Mcdevitt *et al.*, 2003).

1.3.1.3 Regiões bioactivas da matriz extracelular

Os (matri)*cryptic sites* têm sido definidos como sendo locais activos que apenas são expostos depois de alterações estruturais ou conformacionais da MEC. Referem-se aos locais funcionais que se encontram no interior das macromoléculas da MEC e que não estão expostos na superfície das proteínas. Este termo é limitado às regiões bioactivas que derivam directamente das moléculas da MEC e não às que derivam das moléculas associadas à MEC, tais como proteases, inibidores de proteases ou factores de crescimento (Davis *et al.*, 2000). A activação destas regiões requer a modificação estrutural de uma macromolécula da MEC e pode ocorrer por meio de: 1) degradação enzimática, 2) ligação a outras moléculas da MEC ou a receptores de superfície celular, 3) multimerização, 4) força mecânica ou 5) desnaturação devida a mudanças térmicas ou oxidantes (Schenk e Quaranta, 2003; Davis *et al.*, 2000; Davis, 2010). Davis e seus colegas mostram uma lista de (matri)*cryptic sites* conhecidos, as suas funções e o seu mecanismo de exposição (Davis *et al.*, 2000). A sequência Arg-Gly-Asp (RGD) é um dos (matri)*cryptic sites* mais importantes e está presente na fibronectina e em várias outras proteínas da MEC, como no colagénio, vitronectina e osteopontina (Davis, 2010). Esta sequência parece participar na proliferação, migração, sobrevivência celular, na fagocitose, na morfogénese e no processo de reparação de tecidos lesados, bem como na regulação da vasoactividade arteriolar e da resposta angiogénica (Davis *et al.*, 2000). Para os fragmentos bioactivos derivados da mudança estrutural da MEC que contêm (matri)*cryptic sites* expostos, Davis e seus colegas propuseram o termo matriquinas, sendo estas capazes de regular as actividades celulares (Davis *et al.*, 2000; Adair-Kirk e Senior, 2008).

1.3.1.4 Classificação e propriedades das matriquinas

A presença de pequenos péptidos derivados das glicoproteínas do tecido conectivo foi demonstrada em 1960 por Robert e Robert (Maquart *et al.*, 2004). Estudos mais recentes indicam que a maioria das macromoléculas da MEC pode dar origem a matriquinas. Estas, uma vez clivadas, estão livres para interagir com os receptores de superfície celular afectando vários processos biológicos como a degradação da matriz, adesão celular, migração, proliferação, apoptose e síntese de proteínas (Marquet *et al.*, 2004; Bowers *et al.*, 2010). As matriquinas ainda não foram purificadas nem caracterizadas por completo, mas algumas já são conhecidas.

A elastina é considerada uma fonte importante de matriquinas no tecido conectivo normal e patológico. A hidrólise alcalina das fibras elásticas dá origem a uma mistura de péptidos de elastina denominados de *Kappa - elastin* que possui várias actividades típicas das matriquinas, como por exemplo a estimulação da proliferação de fibroblastos. Alguns dos péptidos derivados da elastina estão particularmente implicados na regulação celular. É o caso do VGPGV, capaz de estimular a proliferação de células do músculo liso e diminuir a produção de elastina nestas células, do VGVAPG, que define o local de ligação da molécula do receptor e estimula as MMP-2 nas células fibroblásticas humanas, sugerindo que estes péptidos deverão ter um papel importante na regulação da remodelação do tecido conectivo (Marquart *et al.*, 2004).

As glicoproteínas do tecido conectivo como a fibronectina, por exemplo, contem vários domínios capazes de regular a actividade celular. O domínio com 25 kDa no N-Terminal estimula a expressão da collagenase/MMP-1 por fibroblastos. Outro domínio de 45 kDa induz a síntese de MMP-13 pelos condrócitos, agregando proteoglicanos da cartilagem. Outros péptidos, o IGD, é mitogénico para os fibroblastos (Schor *et al.*, 1999), e o *anastelin* mostrou ter propriedades anticancerígenas (Yi *et al.*, 2001). A trombospondina também dá origem a várias matriquinas como o RfK que participa na activação da transformação do factor de crescimento- β , o CSVTCG, o WSHWSPWS e GVITRIR que apresentam propriedades anti-angiogénicas. Péptidos derivados das lamininas, como o RKRLQVQLSIRT, inibem a morfogénese das glândulas salivares

humanas, o LGTIPG, aumenta a produção e a activação da gelatinase A/MMP-2. A SPARC contém o KKGHK que é angiogénico e activa o crescimento das células endoteliais (Marquart *et al.*, 2004). O *Glycyl-histidyl-lysine* (GHK) é um tripeptídeo proveniente de várias macromoléculas da MEC, especialmente de várias glicoproteínas do tecido conjuntivo e modela a formação de novo tecido conectivo (Marquart *et al.*, 2005).

Como matriquinas derivadas do colagénio, foram caracterizados o DGGRYY, um activador de neutrófilos polimorfonucleares; e o GHK, quimiotático para os monócitos/macrófagos e mastócitos, promove a regeneração do tecido nervoso e estimula a angiogénese *in vivo* (Marquart *et al.*, 2004) e induz, também, a produção de MMPs. Outra matriquina derivada do colagénio XVIII é a endostatina que inibe a proliferação de células endoteliais, migração e crescimento de tumores, induz apoptose e tem propriedades anti-angiogénicas. A restina, uma matriquina homóloga à endostatina derivada do colagénio XV também tem propriedades anti-angiogénicas, mas menores que as da endostatina, inibe a migração das células endoteliais mas tem pouco ou nenhum efeito na sua proliferação (Bellon *et al.*, 2004). Na tabela 1.2 que se segue, estão resumidas algumas matriquinas derivadas dos vários tipos de colagénio e as suas funções.

Tabela 1.2 Matriquinas derivadas do colagénio (adaptado de Schank e Quaranta 2003).

Colagénio	Matriquina	MW(kDa)	Função
I	GHK		Quimiotático para células inflamatórias, produção MMPs, pró-angiogénico.
IV	Arrestan	26	Anti-angiogénica, inibição do crescimento de células tumorais.
	Constatin	24	Anti-angiogénica e pró-apoptótica, inibição do crescimento de células tumorais.
	Tumstatin	28	Anti-angiogénica, inibição do crescimento de células tumorais e inibição da síntese proteica.
XV	Restina/EndostatinaXV	22	Anti-angiogénica, inibição do crescimento de células tumorais.
XVIII	EndostatinaXVIII	20	Anti-angiogénica, inibição do crescimento de células tumorais e apoptótica

Assim, a ideia de que os péptidos tinham propriedades puramente estruturais desvanece e sabe-se agora, que estes apresentam importantes efeitos moduladores sobre o comportamento celular (Li *et al.*, 2004). Estudos revelaram que factores de crescimento como o VEGF e o factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF) são libertados durante a degradação da MEC do intestino delgado do porco ou da bexiga urinária do porco (McDevitt *et al.*, 2003). Estes factores de crescimento são conhecidos como promotores da mitogénese e da diferenciação celular no decorrer do processo de remodelação, no entanto as matriquinas têm um papel importante no recrutamento distal e na mobilização de células progenitoras e estaminais para o local da ferida (Li *et al.*, 2004; Badylak *et al.*, 2001; Gargett, 2006). Num estudo recente Agrawal e seus colaboradores mostraram que ratinhos C57/BL6, cuja falange do terceiro dígito da pata foi amputada, quando tratado com produtos da degradação da MEC da bexiga urinária de porco, apresentavam uma acumulação de células heterogéneas que expressavam marcadores de diferenciação multipotente como Sox2, Sca1 e Rex1. Estes resultados revelam o recrutamento endógeno das células estaminais para o local da lesão em resposta aos produtos de degradação da MEC (Agrawal *et al.*, 2010). Outro estudo

demonstrou que uma única aplicação de produtos derivados da matriz de células de blastema de ratos MRL em feridas de ratinhos B6 induz o crescimento de pelo, derme e epiderme no local da ferida, enquanto que, nos animais que não receberam o tratamento houve a formação de cicatriz. Este estudo sugere que os produtos derivados da matriz são capazes de estimular a regeneração e evitar a formação de cicatriz em mamíferos adultos (Vorotnikova *et al.*, 2010).

1.3.1.5 Utilização de *scaffolds* da matriz extracelular na regeneração de tecidos

A MEC é produzida pelas células residentes de cada tipo de tecido e órgão estando num estado de equilíbrio dinâmico com o seu microambiente em redor. As moléculas estruturais e funcionais da MEC fornecem os meios pelos quais as células adjacentes comunicam umas com as outras e com o ambiente externo, como descrito anteriormente. A MEC é, obviamente, biocompatível já que as células hospedeiras produzem as suas próprias matrizes. Assim, a MEC possui todas as características de um *scaffold* ou de um biomaterial ideal para a engenharia de tecidos (Badylak, 2007). Quando a MEC é utilizada como um *bioscaffold* degradável para a reparação de tecidos, a taxa de degradação é normalmente rápida (Badylak *et al.*, 1998; Rickey *et al.*, 2000). Este processo de degradação é essencial pois *scaffolds* constituídos à base de MEC e processados de forma a serem resistentes à degradação produziram uma resposta inflamatória crónica com deposição de tecido fibroso, sem cura (Gilbert *et al.*, 2007). Pode-se então considerar os *scaffolds* da MEC como veículos temporários para a libertação controlada de factores de crescimento e para a libertação dos produtos de degradação das proteínas que a constituem (Li *et al.*, 2004).

MECs descelularizadas de vários órgãos e tecidos, como do intestino delgado (Badylak *et al.*, 1995), fígado (Brown *et al.*, 2006), bexiga (Reing *et al.*, 2009; Agrawal *et al.*, 2010), válvulas cardíacas (Cebotari *et al.*, 2006), coração e derme (Armour *et al.*, 2006), têm sido utilizadas como *scaffolds* biológicos e na promoção da reconstrução do tecido lesado, facilitando a remodelação e o processo de cura (Badylak, 2007). Os *scaffolds* têm sido comercializados em várias aplicações terapêuticas. A tabela 1.3

identifica vários produtos compostos com MEC actualmente disponíveis para o uso clínico. Os resultados de estudos clínicos têm sido muito positivos, mas há aplicações onde não foram verificados efeitos benéficos. As razões para estes resultados díspares são desconhecidas, mas, provavelmente, estão relacionadas com a selecção dos pacientes, a técnica cirúrgica, ou a falta da compreensão a respeito da utilização óptima de um *scaffold* para a reconstrução de certos tecidos (Badylak, 2007)

Tabela 1.3 Lista com exemplos de *scaffolds* de matriz extracelular comercialmente disponíveis (Badylak, 2007).

Product	Company	Material	Chemical modification	Form	Use
<i>Acellular Oasis[®]</i>	Healthpoint	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Partial & full thickness wounds; superficial and second degree burns
<i>XelmaTM</i>	Molnlycke	ECM protein, PGA, water		Gel	Venous leg ulcers
<i>AlloDerm</i>	Lifecell	Human skin	Cross-linked	Dry sheet	Abdominal wall, breast, ENT/head & neck reconstruction, grafting
<i>CuffPatchTM</i>	Arthrotek	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Cross-linked	Hydrated sheet	Reinforcement of soft tissues
<i>TissueMend[®]</i>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Surgical repair and reinforcement of soft tissue in rotator cuff
<i>Durepair[®]</i>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Repair of cranial or spinal dura
<i>XenformTM</i>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Repair of colon, rectal, urethral, and vaginal prolapse, pelvic reconstruction, urethral sling
<i>SurgiMendTM</i>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Surgical repair of damaged or ruptured soft tissue membranes
<i>PriMatrixTM</i>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Wound management
<i>PermacolTM</i>	Tissue Science Laboratories	Porcine skin	Cross-linked	Hydrated sheet	Soft connective tissue repair
<i>Graft Jacket[®]</i>	Wright Medical Tech	Human skin	Cross-linked	Dry sheet	Foot ulcers
<i>Surgisis[®]</i>	Cook SIS	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Soft tissue repair and reinforcement
<i>Durasis[®]</i>	Cook SIS	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Repair dura matter
<i>Stratasis[®]</i>	Cook SIS	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Treatment of urinary incontinence
<i>OrthADAPTTM</i>	Pegasus Biologicals	Horse pericardium	Cross-linked		Reinforcement, repair and reconstruction of soft tissue in orthopedics
<i>DurADAPTTM</i>	Pegasus Biologicals	Horse pericardium	Cross-linked		Repair dura matter after craniotomy
<i>AxisTM dermis</i>	Mentor	Human dermis	Natural	Dry sheet	Pelvic organ prolapse
<i>SuspendTM</i>	Mentor	Human fascia lata	Natural	Dry sheet	Urethral sling
<i>RestoreTM</i>	DePuy	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Sheet	Reinforcement of soft tissues
<i>Veritas[®]</i>	Synovis Surgical	Bovine pericardium		Hydrated sheet	Soft tissue repair
<i>Dura-Guard[®]</i>	Synovis Surgical	Bovine pericardium		Hydrated sheet	Spinal and cranial repair
<i>Vascu-Guard[®]</i>	Synovis Surgical	Bovine pericardium			Reconstruction of blood vessels in neck, legs, and arms
<i>Peri-Guard[®]</i>	Synovis Surgical	Bovine pericardium			Pericardial and soft tissue repair

A eliminação efectiva de epítomos antigénicos associados com as membranas celulares e componentes intracelulares dos tecidos e órgãos é necessária para minimizar ou evitar uma resposta imunológica adversa. As moléculas que constituem a MEC, no

entanto, são conservadas e bem toleradas mesmo por receptores xenogénicos (Badylak *et al.*, 2009). O objectivo dos protocolos de descelularização é remover todo o material celular sem afectar a composição, a integridade mecânica e a actividade biológica da MEC. Os métodos mais utilizados incluem uma combinação de tratamentos físicos e químicos. Estes métodos parecem ser insuficientes para uma descelularização completa, já que, na maioria dos *scaffolds* de MEC, senão em todos, permanece algum ADN (Knoll, 2001). O processo de descelularização afecta a estrutura e composição da MEC, a intenção deste processo será, então, a maior preservação possível das propriedades mecânicas e biológicas da MEC original (Badylak *et al.*, 2009).

Os *scaffolds* biológicos são muitas vezes desidratados por liofilização ou por pressão a vácuo, permitindo um manuseamento mais fácil e limitando a perda de factores de crescimento durante o armazenamento. As folhas da MEC liofilizadas podem ser trituradas e ficam assim na forma de um pó. Esta forma permite a entrega da MEC como uma suspensão por meio de técnicas minimamente invasivas (por exemplo, injeção) para o local de interesse ou para o fabrico de *scaffolds* tridimensionais através de métodos de compactação. Os *scaffolds* em pó podem ser utilizados para aplicação tópica ou podem ser combinados com polímeros sintéticos para criar *scaffolds* híbridos, enquanto uma forma líquida ou em gel pode expandir a utilidade clínica dos *scaffolds* de MEC. Além disso, as propriedades reológicas do gel podem ser projectadas de forma a serem semelhantes às do tecido que vai ser reparado. Idealmente, os métodos de processamento do gel evitariam ou minimizariam etapas de purificação que podem remover ou destruir os factores de crescimento e os péptidos de baixo peso molecular presentes na MEC nativa (Badylak *et al.*, 2009).

Ao contrário das propriedades mecânicas e estruturais que são dependentes da estrutura 3D intacta, as actividades biológicas dependem justamente do oposto, ou seja, da degradação da estrutura tridimensional. Um *scaffold* biológico de MEC degradável pode ser considerado como um dispositivo de libertação controlada de uma variedade de moléculas funcionais, como mencionado anteriormente. A utilização bem sucedida da MEC de mamíferos como um dispositivo terapêutico dependerá, em grande parte, da capacidade de compreender e tirar proveito da estrutura e das funções do *scaffold* biológico (Badylak *et al.*, 2009).

1.3.2 Eritropoetina

A eritropoetina (EPO) foi apresentada pela primeira vez como hematopoetina através do trabalho pioneiro de Carnot e DeFlandre em 1906 e ficou conhecida como um factor que podia estimular o desenvolvimento de novos glóbulos vermelhos (Fisher, 2003). Mais tarde, Reissmann verificou que a hipoxia estimulava a produção de EPO e, posteriormente, a EPO humana foi purificada, abrindo caminho para a clonagem do gene que codifica a EPO e para a produção da EPO recombinante para uso clínico (Maiese *et al.*, 2008).

1.3.2.1 Estrutura e função da EPO

A EPO é uma glicoproteína com 30,4 kDa (166 aminoácidos) com aproximadamente metade do seu peso molecular derivado de carboidratos que podem variar entre as espécies. É constituída por quatro cadeias glicosiladas, que são importantes para a sua actividade biológica protegendo-a da degradação através de radicais livres de oxigénio (Maiese *et al.*, 2008). Os principais órgãos de produção e secreção da EPO são os rins, o fígado, o cérebro e o útero, sendo a secreção e a produção nos rins maior (Fliser e Haller, 2007) a partir das células peritubulares intersticiais (Fisher, 2003). Também as células epiteliais tubulares, as células endoteliais peritubulares e segmentos do nefrónio mostram ser importantes na produção e secreção da EPO (Lacombe *et al.*, 1991).

Estudos recentes revelaram que a EPO, para além da eritropoiese, apresenta outras funções em órgãos e tecidos, como no cérebro, coração e sistema vascular (Chong *et al.*, 2003; Mikati *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2006). A descoberta da EPO e do seu receptor no sistema nervoso e vascular levou a um grande interesse e entusiasmo para as potenciais aplicações clínicas desta glicoproteína. Através da sua ligação ao seu receptor na superfície das células progenitoras eritróides, a EPO regula a proliferação celular eritróide da medula óssea, a diferenciação e a sobrevivência celular. O receptor da EPO (EPOR) também se encontra em inúmeras linhas não eritróides do sangue, que

incluem os neurónios, microglia, astrócitos e células endoteliais cerebrais, como na mielina dos nervos periféricos humanos (Maiese *et al.*, 2004). Este facto sugere um papel da EPO no desenvolvimento e protecção do sistema nervoso central e periférico. Em estudos básicos e clínicos, a EPO tem sido associada com a modulação do metabolismo celular (Maiese *et al.*, 2008). A EPO é capaz de aumentar a sobrevivência das células em vários tipos de lesões no sistema nervoso (Maiese *et al.*, 2004) e a sua aplicação sistémica reduz a perda celular em lesões da medula espinal (King *et al.*, 2007), o edema cerebral traumático (Verdonck *et al.*, 2007), o trauma cortical e a actividade epiléptica (Mikati *et al.*, 2007). A sua utilização é agora considerada uma estratégia promissora, não só para a eritropoiese, mas também para a manutenção, sobrevivência celular e na modulação das vias inflamatórias (Maiese *et al.*, 2004). O potencial terapêutico e os aspectos negativos da EPO estão descritos nas tabelas 1.4.

Tabela 1.4 Potencial terapêutico e aspectos negativos da EPO (adaptado de Maiese *et al.*, 2008).

Potencial terapêutico	Resultados
Anemia	Melhorias no volume de ejeção do ventrículo esquerdo, aumento de acidente vascular cerebral.
Insuficiência cardíaca congestiva	Melhorias no débito cardíaco, diminuição da utilização de recursos médicos.
Insuficiência cardíaca crónica	Melhoria da função ventricular esquerda.
Diabetes	Melhoria da função cardíaca, protecção das células vasculares.
Traumatismos	Diminuição da mortalidade
Transplante Renal	Previne a rejeição.
Aspectos negativos	Resultados
Cancro da mama	Inibição da apoptose das células cancerígenas.
Cancro com quimioterapia	Enfarte do miocárdio, febre, vômito, parestesias, aumento das infecções do trato respiratório superior.
Hipertensão	Aumento da pressão arterial média.
Cancro da cabeça e pescoço	Diminuição da sobrevivência.
Metástases	Maior progressão da doença
Radioterapia	Diminuição da eficácia
Trombose vascular	Potencial para estenose vascular, trombose.

Vários estudos descrevem ainda outro papel da EPO como um factor pró-angiogénico, comparável aos factores VEGF e bFGF. O paradigma da angiogénese está agora sob a análise com bases na constatação de que as MSC humanas (MSC_h) são recrutadas localmente e contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos

(Zwerzdaryk *et al.*, 2007). Num estudo realizado por Zwerzdaryk e seus colaboradores, foi testada, pela primeira vez, a capacidade da EPO induzir angiogénese em culturas de MSCh, actuando como factor pró-angiogénico, regulado por hipoxia, para o VEGF e bFGF. Em 2007, Zwerzdaryk e colaboradores mostraram pela primeira vez que as MSC expressam o EPOR e são capazes de promover a angiogénese no seguimento de tratamentos com EPO. O EPOR existente nas MSC serve como um receptor de quimiocina para a mobilização das MSC da medula óssea e dos nichos presentes nos tecidos. Neste estudo, a EPO levou ao aumento da proliferação das MSC e das células endoteliais humanas, observando-se de forma consistente que baixos níveis de EPO nas MSC (< 10 U/mL) tem uma função proliferativa, enquanto níveis mais elevados (>30 U/mL) foram bem sucedidos em ensaios de diferenciação, migração, invasão e formação de vasos sanguíneos. A descoberta mais importante do estudo foi que as MSCh podem facilitar a angiogénese, não necessariamente pela participação directa, mas por meio da secreção e do recrutamento de componentes após a sua estimulação. A actividade quimiotática da EPO sobre as MSCh também foi comparada com a do VEGF e bFGF, tendo sido a EPO superior. Estes resultados, podem ajudar a explicar os achados clínicos em que pacientes tratados com EPO apresentam uma maior mobilização e detecção de MSC no sangue periférico. (Zwerzdaryk *et al.*, 2007).

1.3.2.2 EPO na reparação de feridas cutâneas

A EPO contribui para a regeneração de tecidos e melhora a reparação de feridas. A sua utilização controla a regeneração de tecidos lesados onde o crescimento de células endoteliais e a regeneração parenquimal são estimulados. Uma melhor vascularização, estimulada pela EPO, facilita a regeneração de tecidos (Bader, 2010; Maiese *et al.* 2008).

A EPO tem sido utilizada de forma sistémica uma vez que estimula o precursor CD31⁺, correspondente às células endoteliais ou vasculares, que circulam principalmente na corrente sanguínea. No entanto, a administração da EPO deve ser limitada ao local do traumatismo na pele, pois a formação das células vasculares deve ser coordenada simultaneamente com a formação do tecido localizado. Assim, doses

sub-policitémicas deverão ser administradas em injeções repetidas para evitar que ocorram alterações nos períodos de tempo de semi-vida. Em todo o caso, a EPO chegará ao local pretendido através da corrente sanguínea, distribuída sistemicamente no organismo e chegará ainda mais diluída. Na aplicação tópica, no caso de um ferimento recente, o processo de inflamação que ocorre dentro das primeiras vinte e quatro horas, e a formação de uma matriz de fibrina e células endoteliais vasculares, compreendem uma série de enzimas proteolíticas, algumas das quais muito activas, que retiram a eficácia da EPO e de outras proteínas ou péptidos, já que as desactivam e as degradam (Bader, 2010).

A utilização de um hidrogel para a aplicação da EPO para uso tópico poderá ser a solução. Um estudo sobre um hidrogel de celulose com EPO incorporada, quando aplicado topicamente, levou a um rápido fecho de feridas. Com a aplicação tópica deste hidrogel contendo EPO, foi verificada a reepitalização das regiões da ferida, assim como a formação de uma rede vascular. As células estaminais neuronais também foram estimuladas, notando-se melhoria na sensibilidade da pele durante a reparação da ferida. Também maiores quantidades de EPO podem ser administradas utilizando formulações em gel diminuindo assim os efeitos secundários significativos. As quantidades necessárias de EPO variam consideravelmente dependendo do tamanho da ferida e da quantidade de gel necessário para a área da ferida. Já que a ferida é definida não só pela sua área, mas também pela sua profundidade, a dose poderá variar muito pois a ferida será preenchida com o hidrogel (Bader, 2010).

1.4 Objectivos

Os objectivos deste trabalho são:

. Caracterização dos derivados da digestão com pepsina da UBM e avaliação da actividade quimiotáctica e mitogénica de matriquinas nas células progenitoras/estaminais através de estudos *in vitro*.

. Avaliação da capacidade regenerativa dos produtos resultantes da digestão da UBM *in vivo* usando modelo de feridas na pele de ratos Balb/c.

. Incorporação da EPO num nanogel de dextrino, uma vez que um sistema que permita a libertação controlada da proteína pode trazer vantagens para posteriores aplicações *in vivo*.

2. Materiais e métodos

2.1 Reagentes

Neste trabalho todos os reagentes utilizados foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (*St. Louis*, USA), salvo indicação em contrário.

2.2 Células e meio de cultura

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando duas linhas celulares: 1) fibroblastos 3T3 de embrião de rato (ATCC CCL-164), cultivados em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de *newborn calf serum* (*Invitrogen*) e 1% de penicilina/estreptomicina (PE); 2) células estaminais mesenquimais *Rattus norvegicus* (*Wister*) MSCr (obtidas como descrito na secção 2.9), cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e 1 % de PE. Ambas as linhas celulares foram mantidas a 37° C, em atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. Depois de atingirem 80% de confluência, as células foram tratadas com uma solução de 0,05% (w/v) tripsina-EDTA e subcultivadas nos respectivos meios.

2.3 Animais

Os estudos *in vivos* foram realizados utilizando ratos BALB/c machos (*Charles River*, Barcelona, *Spain*), com 12 e 16 semanas de idade. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Abel Salazar durante os ensaios. Os procedimentos com animais foram realizados de acordo com a Convenção Europeia para a Protecção dos Animais Vertebrados Utilizados para Fins Experimentais e Outros Fins Científicos (ETS 123) e da Directiva 86/609/CEE, com as regras Portuguesas (DL 129/92).

2.4 Descelularização da MEC

A matriz do urotélio da bexiga de porco (UBM) foi obtida segundo o descrito em trabalhos anteriores. Resumidamente, depois da recolha da bexiga, o tecido adiposo e o excesso de colagénio do tecido conectivo, à volta da bexiga, foram removidos mecanicamente e a bexiga limpa de resíduos de urina com água. Foi usada água com pressão para expandir a bexiga estirando o músculo liso. O músculo foi então removido delicadamente, com um bisturi, retirando a superfície abluminal da bexiga. As células uroteliais foram removidas emergindo a membrana resultante em NaCl (1,0 N), obtendo-se a membrana basal das células uroteliais e a lâmina própria subjacente. O biomaterial foi referido como UBM (Freytes *et al.*, 2008).

As amostras de UBM foram tratadas com uma solução aquosa de ácido peracético (0,1, v/v) e etanol (4%, v/v), ficando 2 h em agitação para esterilização e para completar a descelularização. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,4), durante 15 min em cada lavagem, e duas vezes com água desionizada (2 x 15 min), para remover todos os resíduos de ácido peracético. No final as amostras foram liofilizadas e congeladas (Agrawal *et al.*, 2010; Freytes *et al.*, 2008; Freytes *et al.*, 2004).

2.5 Hidrólise enzimática da UBM

O material liofilizado foi triturado e digerido com pepsina 1 mg/mL em 0,01 M HCl, durante 48 h, com agitação e a 25° C, obtendo-se uma mistura de hidrolisado com concentração final de 10 mg de UBM/mL (Agrawal *et al.*, 2010; Brennan *et al.*, 2008; Freytes *et al.*, 2008; Freytes *et al.*, 2004). As amostras que não se encontravam totalmente dissolvidas ao fim das 48 h, foram hidrolisadas por mais 48 h à temperatura média de 30° C. Por último, o pH da solução viscosa resultante foi ajustado a pH 7,4 utilizando uma solução de NaOH (0,1 M), de modo a inactivar irreversivelmente a pepsina (Agrawal *et al.*, 2010; Freytes *et al.*, 2008; Freytes *et al.*, 2004).

2.6 Fraccionamento do hidrolisado

O hidrolisado foi fraccionado por ultrafiltração (*Amicon Ultrafiltration cell*), utilizando uma membrana de nitrocelulose (25 mm), com *Molecular Weight Cut-off* (MWCO) de 30 kDa (*Millipore*). Posteriormente, amostras correspondentes ao hidrolisado total e à fracção com peso molecular (PM) superior a 30 kDa foram liofilizadas e esterilizadas por óxido de etileno. O hidrolisado depois de liofilizado não foi totalmente solúvel, por esse motivo procedeu-se à centrifugação e caracterizou-se o sobrenadante (fracção solúvel do hidrolisado). A fracção com PM inferior a 30 kDa foi filtrado, com uma membrana de acetato de celulose com 30 mm, e poros de 0,2 μ m (*Orange Scientific GyroDisc*) para garantir a esterilização.

2.7 Separação dos péptidos por electroforese

A análise das fracções resultantes da ultrafiltração foi efectuada por electroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo o sistema de Laemmli, onde se utiliza um gel com poro e pH descontínuos. O SDS-PAGE consiste num tipo de electroforese em que as amostras são desnaturadas pela temperatura na presença de agentes desnaturantes (β -mercaptoetanol, um agente redutor, que rompe as pontes dissulfeto das proteínas e SDS, um detergente, que confere carga negativa às proteínas). Nestas condições, a migração das proteínas no gel de poliacrilamida é dependente do seu peso molecular.

2.7.1 Análise de proteínas por SDS-PAGE (10%)

Os géis SDS-PAGE foram preparados segundo o descrito na tabela 2.1 de modo a obter o gel resolvente com concentração 10%, pH 8,8 e contendo 0,2% (p/v) de SDS, e um gel concentrador com concentração 4% e pH 6,8. O tampão usado na electroforese era constituído por Tris-HCl (17,7 mM), SDS (0,2%, p/v) e glicina (0,2 M).

Tabela 2.1 – Composição dos géis concentrador (4%) e resolvente (10%) para análise das amostras hidrolisadas por SDS-PAGE.

Solução	Gel concentrador 4%	Gel resolvente 10%
	Volume (mL)	Volume (mL)
40% acrilamida (BioRad)	0,480	2,43
2% bisacrilamida (BioRad)	0,260	1,34
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,26	-
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,5
SDS 10%	0,050	0,1
H₂O	2,92	3,58
10% PSA	0,025	0,050
TEMED	0,005	0,005
Volume final (mL)	5	10

Após a polimerização da poliacrilamida, que se iniciou com a adição de persulfato de amónio (PSA) e foi acelerada com TEMED – N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina, as amostras das fracções resultantes da ultrafiltração foram misturadas com o tampão da amostra (5x concentrado: 3,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% de SDS; 25% β-mercaptoetanol; 50% glicerol; e 0,01% azul de bromofenol) e desnaturadas por aquecimento (100° C), durante 5 min. Depois de terminada a electroforese, os géis foram corados com *Coomassie Blue* (solução aquosa contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 0,05% de Azul brilhante *coomassie* G-250). A descoloração foi efectuada com solução 5% de metanol e 7% de ácido acético glacial em água.

2.7.2 Análise de péptidos por electroforese SDS-PAGE Tris-Tricina (16,5%)

As fracções resultantes da ultrafiltração foram analisadas em géis de Tris-Tricina, que permite a resolução de péptidos com PM inferior a 30 kDa. Este sistema baseia-se igualmente na técnica descrita na secção 2.7. Os géis de Tris-Tricina foram preparados com a solução do gel resolvente com concentração 16,5%, pH 8,45, contendo 0,3% (p/v) de SDS, e pela solução do gel concentrador a 4% (com composição igual à referida anteriormente para os géis de SDS-PAGE). A solução tampão do ânodo, usada na electroforese, era constituída por 2,42% (p/v) Tris-base (pH 8,9) e 92 % (v/v) água e a solução tampão do cátodo, era constituída por 1,21 % (p/v) Tris-base (pH 8,2), 1,79% (p/v) Tricina, 0,1 % (p/v) SDS (o pH foi ajustado com ácido acético). Na tabela 2.2 estão apresentadas as quantidades de acrilamida e bisacrilamida, bem como as quantidades dos tampões usadas na preparação do gel resolvente para os géis de 16,5%.

Tabela 2.2 – Composição do gel resolvente 16,5% de Tris-Tricina.

Solução	Gel concentrador
	Volume (ml)
40% Acrilamida/Bis 37,5: 1 (2,6%)	4,12
Tris-SDS, pH 8,45	3,34
H ₂ O	1,49
Glicerol	1,06
PSA 10%	0,050
TEMED	0,005
Volume total	10

Após a polimerização do gel, as amostras foram misturadas com o tampão da amostra Tris-Tricina (1x concentrado: 5% Tris-base 1 M, pH 6.8; 20% (v/v) SDS 2%; 12

% de glicerol, 2 % de β -mercaptoetanol; 0,01 % de azul brilhante de *coomassie* G-250) e aquecidas a 40° C, durante 30 min. Terminada a electroforese, o gel ficou 30 min numa solução de fixação (solução aquosa contendo 10% de ácido acético, 50% de metanol) e foi posteriormente revelado pelo método de *Coomassie Blue*. Após a coloração foi aplicada a solução descorante, até se visualizarem as bandas correspondentes às proteínas.

2.8 Quantificação da proteína total

A proteína total das amostras de UBM e as suas fracções foi quantificada, utilizando o *BCATM Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific*) seguindo as indicações do fabricante. Como padrão utilizou-se a albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL).

2.9 Recolha das células estaminais mesenquimais de rato (MSCr)

As MSCr foram extraídas assepticamente das tíbias e fémures de *Rattus norvegicus* Wistar adultos como descrito por Gniecchi e Melo (Gniecchi e Melo, 2009). Os ossos foram extraídos dos animais e os músculos envolventes do osso foram removidos. As células foram extraídas da medula óssea usando DMEM, suplementado com 10% FBS e 2% PE – designado por DMEM completo – com a ajuda de uma seringa com agulha (23 Gx1^{1/4}”).

Depois, a suspensão celular foi centrifugada (10 min, 300 g, 4° C) e as células ressuspendidas em meio de cultura. As células mononucleadas foram obtidas utilizando Histopaque, seguindo as recomendações do fabricante. O histopaque permite a separação das células mononucleadas, já que, durante a centrifugação, os eritrócitos são agregados pela *polysucrose* (um dos constituintes do Histopaque) e rapidamente

sedimentam, enquanto que os linfócitos e outras células mononucleadas permanecem na interface plasma-Histopaque. Devido à elevada densidade dos granulócitos, estes ficam separados das células mononucleadas. No final das lavagens, as células foram ressuspensas em DMEM completo contendo, 20% FBS, semeadas em placas de poliestireno de 6-poços e observadas ao microscópio.

2.10 Avaliação da bioactividade das amostras e fracções da UBM

2.10.1 Ensaio de proliferação celular

O efeito na proliferação celular dos péptidos obtidos por digestão da UBM foi avaliado utilizando duas linhas celulares, MSCr (2×10^4 células/poço) e fibroblastos 3T3 de embrião de rato (2×10^3 células/poço). As células foram semeadas em placas de poliestireno de 24 poços e incubadas durante 3 h. Posteriormente, as células não aderidas foram removidas e adicionou-se meio fresco contendo diferentes concentrações das amostras (0, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$). O crescimento celular às 0, 24, 48 e 72 h foi avaliado através do ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide), que mede a actividade metabólica mitocondrial. Este método é baseado na redução do sal de tetrazólio a formazano pela actividade da desidrogenase mitocondrial. A expansão do número de células viáveis resulta num aumento na actividade global das desidrogenases e, consequentemente, no aumento na quantidade de corante formazano formado. Para isso, três horas antes do final do período de incubação, o MTT foi adicionado a cada poço e os cristais de formazano obtidos solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorvância lida a 570 nm.

A análise estatística do ensaio de proliferação foi efectuada utilizando *software GraphPad Prism 3.05*. Foi aplicado o *Two-way Analysis of Variance* (ANOVA) e o teste *Bonferroni* para comparar os *scores* das amostras e o controlo positivo.

2.10.2 Ensaio de migração celular

A capacidade dos produtos derivados da UBM promoverem a migração das MSCr foi avaliada utilizando o sistema *BD BioCoat™ Growth Factor Reduced Matrigel™ Invasion Chamber*, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as MSCr foram incubadas em DMEM, com 2,5% FBS, durante 12 h. Depois as células foram tripsinizadas e resuspensas (5×10^4 células/mL) em DMEM sem FBS durante 2 h.

As câmaras de migração foram re-hidratadas com meio de cultura durante 2 h, a 37° C, sendo depois o meio substituído pelas amostras de UBM hidrolisada, DMEM sem soro (controle negativo) ou DMEM contendo 20% FBS (controle positivo). Cada amostra de UBM hidrolisada continha uma concentração de 100 µg/mL, em meio com 2,5% BSA. À parte superior das câmaras de migração foi adicionada a suspensão celular ($2,5 \times 10^4$ células/câmara) e incubou-se durante 12 ou 24 h.

No final, lavou-se a membrana de cada câmara com PBS, para remover o matrigel, e coraram-se as células com uma solução de metanol-DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), durante 10 min, a -20° C. Passados os 10 min, as membranas foram novamente lavadas com PBS e as células que não migraram foram removidas com um cotonete antes das membranas serem destacadas da câmara com bisturi. As membranas (invertidas) foram colocadas numa lâmina e as células foram contadas no microscópio de fluorescência. O índice de migração foi calculado, dividindo o número de células migradas na presença dos produtos de degradação da UBM, pelo número de células migradas no controle negativo, multiplicando o valor por 100 (Li *et al.*, 2004).

Posteriormente, este ensaio foi repetido utilizando a câmara da *Neuro Probe* AP48 (*Neuro Prob*, Gaithersburg, MD), como descrito por Agrawal e colegas (2010), com algumas variações. Resumidamente, as MSCr ficaram em DMEM com 0,5% FBS inativado durante 14 – 17 h. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e resuspensas (6×10^5 células/mL) em DMEM sem FBS e incubadas durante 1 h. O

filtro de polycarbonato, com poros de 8 µm foi revestido com colagénio I, por imersão numa solução de 0,05 mg/mL de colagénio de cauda de rato (BD Biosciences). Os produtos derivados da UBM foram adicionados na concentração final de 100 µg/mL aos poços (parte inferior da câmara), o filtro colocado por cima destes poços e a câmara montada de acordo com as instruções do fabricante. As células (3×10^4 células/poço) foram adicionadas à parte superior da câmara e incubadas durante 12 – 24 h. As células que não migraram foram retiradas com lavagens (PBS), enquanto que as células migradas foram fixadas em metanol e coradas com DAPI e, posteriormente, contadas no microscópio de fluorescência.

2.11 Ensaios *in vivo* utilizando modelo de feridas em pele de ratos Balb/c

O ensaio foi realizado com 12 ratos Balb/c machos que foram anestesiados com uma mistura de catomicina (*Imalgene^R*) e xilazina (*Rompum^R*) antes do procedimento cirúrgico. Foram feitas feridas, uma de cada lado, no dorso dos animais com um *punch* de 3 mm de diâmetro. Os animais foram divididos em 2 grupos (6 animais por grupo), em que um dos grupos recebeu o tratamento do hidrolisado da UBM e o outro grupo foi tratado com a fracção solúvel do hidrolisado, ambos os tratamentos correspondem a 5 mg/mL de proteína total. Cada animal, com duas feridas, recebeu numa o tratamento específico e na outra PBS (controlo negativo). Foram administrados 20 µL de PBS ou das respectivas amostras topicamente nos dias 1, 3, 6 e 8 e cada animal recebeu cerca de 20 µL de dexametasona (0,25 mg/Kg) no 1º e 3º dia.

2.11.1 Análise histologia das feridas

Os animais foram fotografados nos dias 8, 15 e 18 do ensaio. Estes foram sacrificados ao oitavo e décimo oitavo dia, sendo anestesiados com isoflurano antes do deslocamento cervical. As feridas foram extraídas para examinação histológica com a ajuda de tesouras e pinças. Os tecidos foram fixados em formol, durante 24 h.

Posteriormente, foram cortadas o mais longitudinalmente possível no centro da ferida e processadas, passando por diferentes soluções de álcool (70%, 95%, 100%) e xilol para desidratarem. Depois deste processamento foram incluídas em parafina e cortadas com 2 μ m de espessura, tendo sido colocadas em lâminas e incubadas a 60° C durante 30 min para fixação. Posteriormente, as lâminas passaram por um processo inverso ao do processamento (passando em primeiro lugar pelo xilol, depois pelas soluções de álcool), retirou-se a parafina e coraram-se as amostras com hemotoxilina-eosina (a hematoxilina cora os núcleos das células com a cor roxa e a eosina cora o citoplasma celular com a cor vermelha) para a análise histológica por observação microscópica.

2.12 Ensaio de incorporação da EPO no nanogel de dextrino

Os nanogeis (NGs) de dextrino foram sintetizados como anteriormente descrito por Gonçalves e colegas (Gonçalves *et al.*, 2007). O dextrino liofilizado foi dissolvido em água a uma concentração de 1 mg/mL e o complexo nanogel/EPO foi formado misturando (16 h, com agitação) volumes iguais de uma solução de EPO (200 mU/mL) e a solução de NGs, obtendo-se uma concentração final de EPO de 100 mU/mL de NGs de 0,5 mg/mL.

A incorporação da EPO no nanogel dextrino foi avaliada quantificando a EPO em solução (livre) por *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), através do *Quantikine^R IVD^R Human EPO Immunoassay* (R&D Systems), seguindo as indicações do fabricante. Sucintamente, foi adicionado a solução *EPO assay Diluent* aos poços da microplaca, seguindo-se a adição das amostras ou dos padrões. A placa foi coberta com papel de alumínio e incubada 2 h à temperatura ambiente. A solução foi retirada dos poços e adicionou-se o *EPO conjugate*, voltando-se a cobrir a placa com papel de alumínio e incubando mais 2 h à temperatura ambiente. No final, retirou-se a solução e fizeram-se 4 lavagens com a solução *Wash*. Adicionou-se a solução de substrato (*substrate*) em cada poço, deixando-se 20 – 25 min à temperatura ambiente antes de adicionar a solução de paragem da reacção (*Stop*) e ler a absorvância a 450 nm.

Foram analisadas as seguintes amostras: NG, EPO/NG, EPO/NG/20% FBS e PBS com 20% de FBS. As amostras foram ultrafiltradas usando o sistema *centricon* com Molecular MWCO de 100 kDa (*Milipore*, MA, USA) para separar a EPO livre da incorporada no NG.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos produtos da hidrólise da UBM

Na digestão enzimática da UBM foi utilizada a pepsina, conforme o descrito anteriormente (Reing *et al.*, 2009). A utilização de papaína ou collagenase também está descrita, contudo a inactivação dessas enzimas é mais complexa do que a da pepsina, que é inactivada ajustando o pH (Vorotnikova *et al.*, 2010).

Tendo em conta os objectivos deste trabalho, começou-se por caracterizar o hidrolisado resultante da digestão enzimática da UBM (10 mg/mL), determinando a quantidade de proteína total solúvel, e os PM dos péptidos obtidos. Nas condições usadas obteve-se em média $25 \pm 3,6$ mg de proteína solúvel a partir de 100 mg de UBM tratada com pepsina.

O hidrolisado foi ultrafiltrado, utilizando uma membrana com MWCO de 30 kDa, para um fraccionamento inicial. Assim, obtiveram-se duas fracções: uma com péptidos de PM superiores a 30 kDa e outra com peptidos com PM inferiores a 30 kDa. Esta separação foi realizada para comparar as diferenças na bioactividade entre as diferentes fracções, sendo esperada a detecção de actividade nas fracções de menor peso molecular, uma vez que as matriquinas normalmente são pequenos péptidos. A maioria das matriquinas já identificadas apresentam PM com cerca de 20 – 30 kDa, embora já tenham sido reconhecidas actividades de recrutamento celular em péptidos com PM entre os 5 – 16 kDa (Schenk e Quaranta, 2003; Li *et al.*, 2004).

Na literatura está descrito que, dependendo da origem da MEC utilizada, podem-se obter péptidos com PM entre 15 - 250 kDa através da degradação com pepsina (Brennan *et al.*, 2008) e PM entre os 5 -16 kDa através de métodos físicos e químicos (Li *et al.*, 2004). Neste trabalho a análise por electroforese revelou que os produtos derivados da digestão da UBM contêm vários péptidos com tamanhos entre 15 - 250

kDa, o que está de acordo com o descrito na literatura (Figura 3.1). As proteínas detectadas em SDS-PAGE (10%) apresentam diferentes intensidades, sugerindo diferenças quantitativas entre as respectivas moléculas no hidrolisado. No entanto, pela análise do gel é possível concluir que a maior parte das proteínas nas amostras têm PM superior a 25 kDa, indicando que a digestão com pepsina poderá não ser suficiente para obtenção de uma amostra essencialmente constituída por pequenos péptidos ao contrário dos métodos de degradação da MEC que usam ácidos e temperaturas extremas, mas que não são um modelo fisiológico relevante (Reing *et al.*, 2009). Por isso, neste trabalho foi utilizado um método de digestão enzimática, mais relevante do ponto de vista fisiológico - a pepsina – uma enzima que está presente na maioria dos mamíferos e que tem bem caracterizados os mecanismos de clivagem de péptidos.

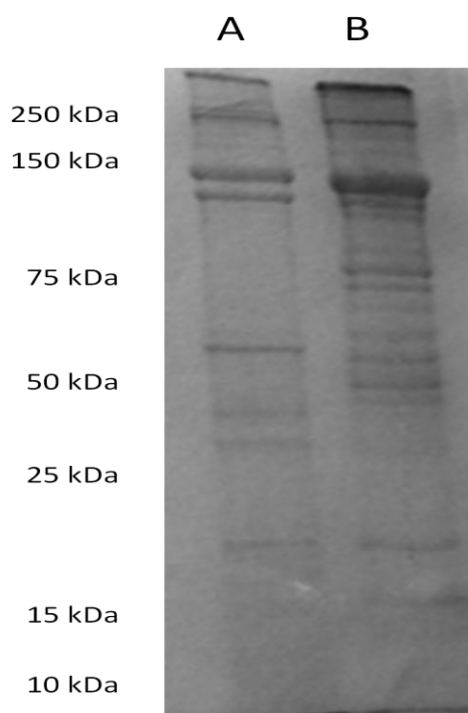


Figura 3.1 Imagem de gel SDS-PAGE a 10%, em que A representa a UBM antes da digestão enzimática e B representa a UBM depois da digestão.

As proteínas detectadas em géis Tris-tricina reforçam a ideia de que a digestão com pepsina resultou, em maior parte, em proteínas com PM superior a 25 kDa. Nas amostras da fracção com PM inferior a 30 kDa não foram observadas proteínas, talvez por estas amostras, depois da ultrafiltração ficarem muito diluídas (Figura 3.2 e 3.3).

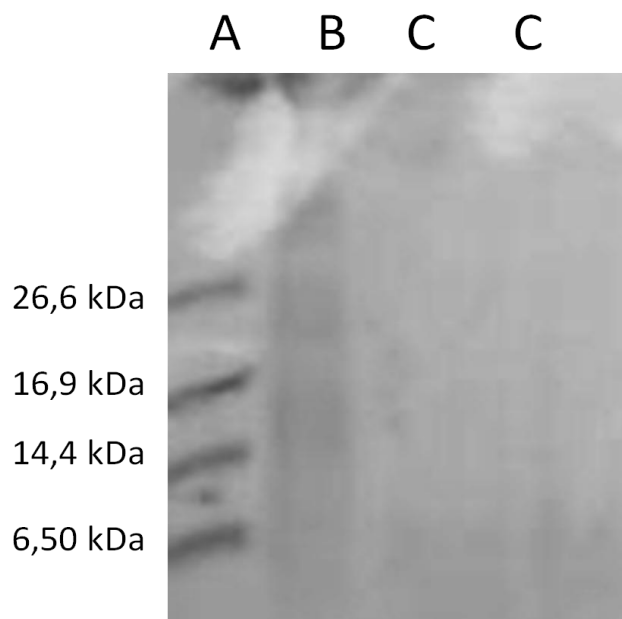


Figura 3.2 Imagem de gel Tris-tricina a 16,5%, em que A corresponde ao marcador de PM, B ao hidrolisado e C à amostra com PM <30 kDa.

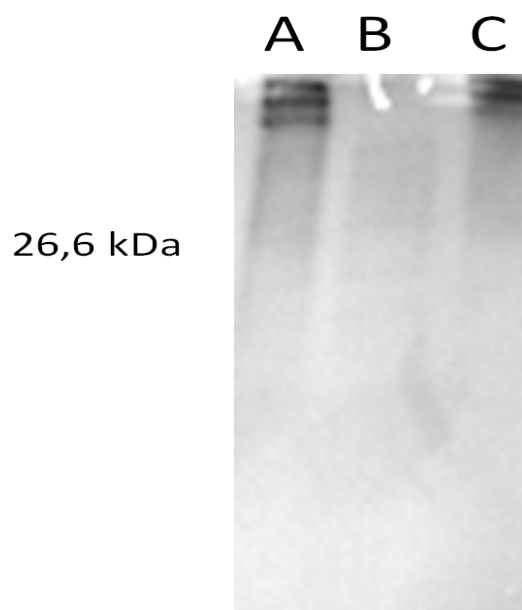


Figura 3.3 Imagem de gel Tris-tricina a 16,5%, em que A representa o hidrolisado, B representa a fracção solúvel e C representa a amostra com PM >30 kDa.

3.2 Avaliação da actividade mitogénica e quimiotática dos produtos derivados da hidrólise da UBM

Estudos anteriores mostraram que as moléculas derivadas da MEC no decorrer de tratamentos com ácido, temperatura e enzimas, retêm a bioactividade, nomeadamente, ao nível da angiogenese (Li *et al.*, 2004), migração celular (Li *et al.*, 2004; Badylak *et al.*, 2001; Reing *et al.*, 2009), proliferação (Reing *et al.*, 2009) e antimicrobiana (Brennan *et al.*, 2006). Neste trabalho, a bioactividade dos derivados da UBM foi avaliada nas MSCr, já que estes produtos mostraram promover o recrutamento de células derivadas da medula óssea. Como foi demonstrado que as células estaminais participam activamente na remodelação de tecidos, podendo ser as responsáveis pela prevenção da formação de tecido cicatricial em lesões nos mamíferos sem capacidade regenerativa, interessava verificar a resposta das MSCr aos péptidos derivados da degradação da UBM (Badylak *et al.*, 2001).

A capacidade proliferativa das MSCr tratadas com os derivados da UBM e com as fracções com PM superiores e inferiores a 30 kDa, com concentração de 100 µg/mL de proteína total dissolvida, foi avaliada. Nenhuma das fracções apresentou um crescimento superior ao do controlo (DMEM suplementado com 10% FBS), revelando até alguma inibição no crescimento celular (Figura 3.4). Foi efectuada uma análise da variância bifactorial (ANOVA) que mostrou que as condições testadas, o tempo e a interacção entre os dois factores são significativos ($p < 0,05$). Também foram verificadas diferenças significativas no crescimento das MSC em relação ao controlo em todas as condições testadas (*Bonferroni* $p < 0,05$), com excepção da condição com PM <30 nas primeiras 24 h de estudo (*Bonferroni* $p > 0,05$).

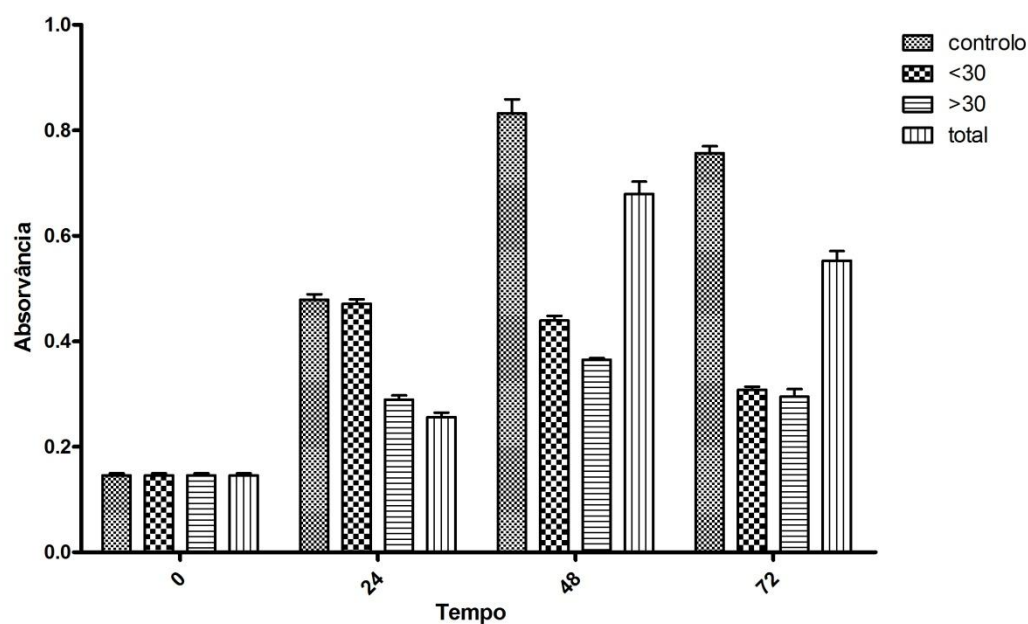


Figura 3.4 Proliferação das MSCr tratadas com o hidrolisado, com a fracção PM > 30 kDa e com a fracção PM <30 kDa, ao longo de 72 h. A concentração de proteína total dissolvida em todas as fracções é 100 µL/mL. As respostas proliferativas foram avaliadas através do MTT.

Resultados semelhantes foram verificados em ensaios de proliferação com fibroblastos tratados com as duas fracções e com a proteína solúvel do hidrolisado (Figura 3.5).

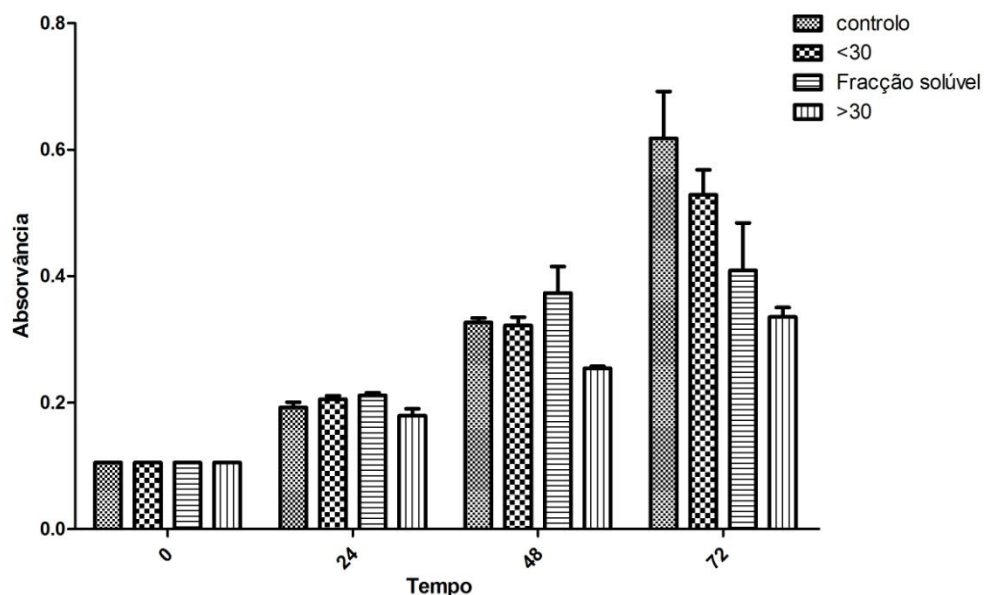


Figura 3.5 Proliferação dos fibroblastos tratados com: a fracção solúvel do hidrolisado, a fracção PM > 30 kDa e a fracção PM <30 kDa, ao longo de 72 h. A concentração de proteína total dissolvida em todas as fracções é 100 µL/mL. As respostas proliferativas foram avaliadas utilizando MTT.

Seguiu-se o estudo com o hidrolisado total testando-se diferentes concentrações de proteína total dissolvida (10, 50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{MI}$).

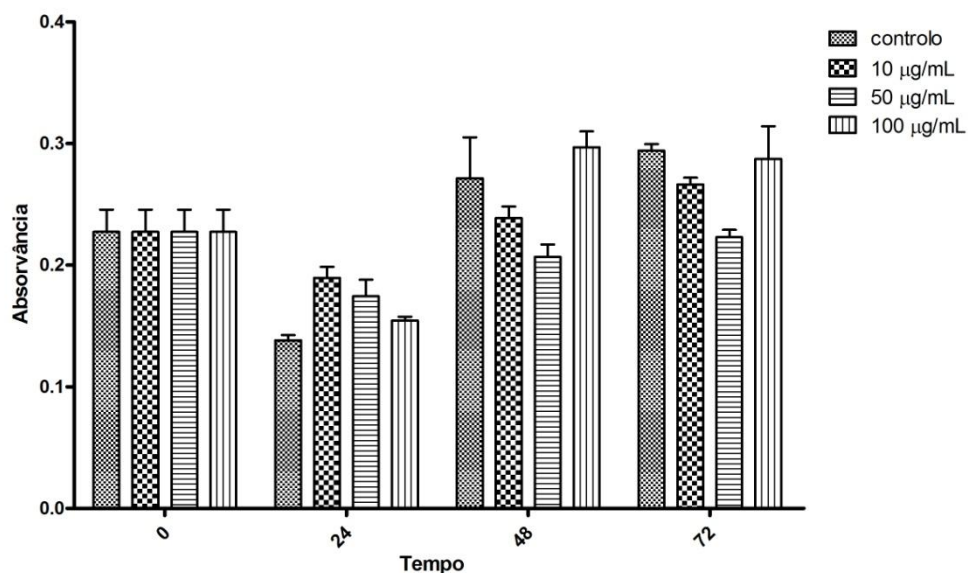


Figura 3.6 Resposta proliferativa das MSCr, ao longo de 72 h, na presença do hidrolisado de UBM com diferentes concentrações de proteína total dissolvida. As respostas proliferativas foram avaliadas através do ensaio MTT.

Não foram encontradas diferenças significativas no crescimento das MSC em relação ao controle na maioria das condições testadas (*Bonferroni*, $p > 0,05$). Estes resultados encontram-se representados nas figuras 3.6 e 3.7.

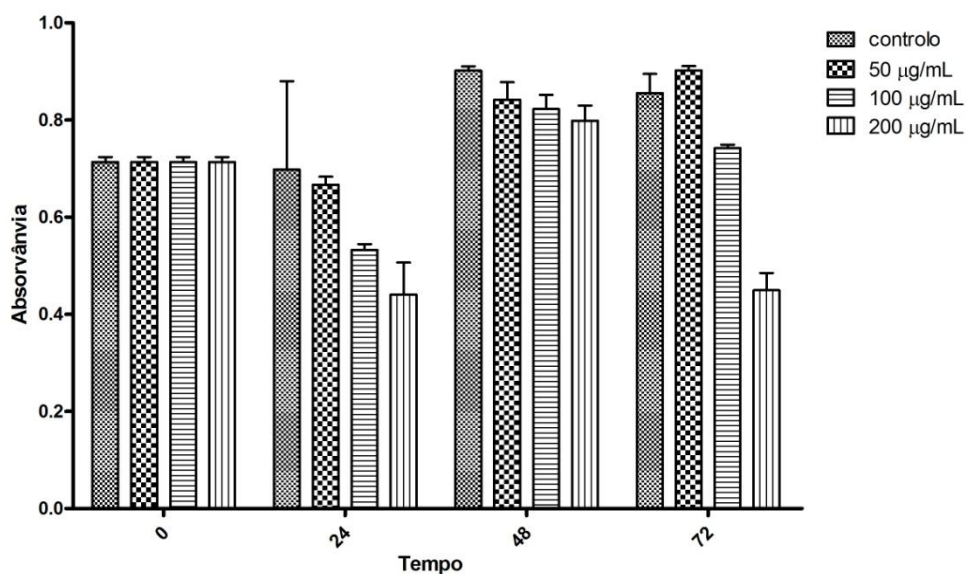


Figura 3.7 Resposta proliferativa das MSCr, ao longo de 72 h, na presença do hidrolisado de UBM com diferentes concentrações de proteína total dissolvida. As respostas proliferativas foram avaliadas através do ensaio MTT.

Resultados contrários foram verificados para as células MRL-B, em que os produtos de degradação da UBM aumentaram a proliferação em resposta a 78,9 µg proteína/mL do hidrolisado (Reing *et al.*, 2009). Num estudo de Vorotnikova e seus colaboradores, utilizando um tipo diferente de MEC (isolada de um blastema MRL) o mesmo resultado foi verificado para o mesmo tipo de células, no entanto a MEC- MRL do blastema foi enriquecida com vários factores de crescimento incluindo o KGF, bFGF, HGF e VEGF (Vorotnikova *et al.*, 2010). Os factores de crescimento, como referido anteriormente, têm um papel significativo na proliferação e diferenciação das células progenitoras e estaminais no decurso do processo de remodelação (McDevitt *et al.*, 2003). Vorotnikova e seus colaboradores mostraram que a heparina presente na maioria das MEC, protege factores de crescimento como o bFGF da inactivação da pepsina, ligando-se a eles e assim protegendo-os da temperatura, pH ou degradação proteolítica (Vorotnikova *et al.*, 2010). No entanto, neste trabalho não foi confirmada a presença de factores de crescimento nem a preservação da sua bioactividade.

Embora neste trabalho o objectivo fosse testar o efeito das matriquinas derivadas da UMB, os factores de crescimento podem ter tido um papel importante nos resultados

obtidos, já que foram identificados noutros estudos onde se realizaram ensaios de proliferação. Na lâmina própria da bexiga urinária de porco, foram identificados alguns tipos de factores de crescimento, sendo os mais predominantes os VEGF, o KGF e o PDGF-BB que estão relacionados com o crescimento celular e a regeneração de tecidos (Chun *et al.*, 2007). A bioactividade destes factores de crescimento que permanecem na matriz depois da descellularização foi confirmada através de testes de proliferação realizados por Chun e seus colaboradores (Chun *et al.*, 2007). Assim, a falta de alguns factores de crescimento na UBM descellularizada obtida, pode estar na origem da falta de actividade proliferativa verificada neste trabalho.

O facto do hidrolisado permanecer durante mais tempo no processo de digestão com pepsina (mais 48 h sobre o tempo utilizado noutros estudos), também poderá ter afectado de alguma forma a bioactividade dos factores de crescimento ou das matriquinas. Em estudos futuros, a trituração da UBM deverá ser realizada de forma mais eficiente para se obter um pó, para que a digestão, e consequentemente a dissolução, seja mais fácil e mais rápida.

Outro ponto que poderá ser importante é a adesão das células plaqueadas. Num estudo de Chun e seus colaboradores, verificou-se que há aumento da proliferação celular quando as proteínas provenientes da lâmina própria são misturadas com as células e plaqueadas em simultâneo. Estes resultados poderão ser devido às moléculas de adesão como o colagenio, laminina, elastina, entre outras, presentes na lâmina própria. A co-existencia de factores de crescimento e moléculas de adesão podem acelerar a proliferação celular (Chun *et al.*, 2007). Pode-se especular que os derivados destas proteínas de adesão, mantenham as mesmas propriedades na mistura hidrolisada e facilitem a proliferação. Assim, estudos de proliferação, adicionando os derivados da UBM às células quando estas estão a ser plaqueadas poderão ser realizados para se comprovar ou não estas suposições.

Para avaliar a actividade quimiotática o hidrolisado foi testado em quatro ensaios de migração, utilizando o sistema *BD BioCoat™ Growth Factor Reduced Matrigel™ Invasion Chamber*. Embora apenas tenha sido possível a contagem de células em dois

ensaios (uma vez que as condições do ensaio tiveram que ser optimizadas), os resultados revelaram um índice de migração entre os 250 - 300%, em relação ao controlo negativo. Com as restantes fracções obtiveram-se índices de migração entre os 129 – 232% para a fracção com PM inferiores a 30 kDa (testada em quatro ensaios), e de 212% para a fracção de PM superiores a 30 kDa (resultado obtido num único ensaio). Na fracção total solúvel do hidrolisado, o índice obtido foi de 368% (resultado correspondente também a um único ensaio). A tabela 3.1 sumariza os resultados obtidos nos ensaios de migração, descrevendo o número de células migradas e o índice de migração em relação ao controlo.

Tabela 3.1 Resultados obtidos nos ensaios de migração utilizando o sistema BD *BioCoat™* Growth Factor Reduced Matrigel™ Invasion Chamber.

	Controlo negativo	PM <30 kDa	PM >30 kDa	Hidrolisado total	Fracção solúvel do hidrolisado total
Número de células migradas	25	58	54	75	-
	16	-	-	40	54
	24	31	-	-	-
	14	28	-	-	-
Respectivos índices de migração		232%	212%	300%	-
		-	-	250%	368%
		129%	-	-	-
		200%	-	-	-

As diferenças obtidas nos resultados nos diferentes ensaios deveu-se, essencialmente, à dificuldade encontrada no procedimento de lavagem das membranas de matrigel, uma vez que a membrana não pode ser danificada, a remoção do matrigel nem sempre foi conseguida de forma eficaz, ficando com alguns aglomerados de gel, o que, por vezes, tornou difícil a visualização das células. Para além disso, a identificação das células migradas e as não migradas também constituiu um dos problemas neste ensaio, assim como, a formação de bolhas de ar entre o meio de cultura com a amostra e a membrana, que também poderão ter estado na origem das diferenças encontradas na

migração de células, nomeadamente no controlo positivo e na fracção correspondente a PM >30 kDa, que levou à não validação dos resultados. Estes factos poderão ter diminuído o índice de migração em todas as fracções apresentadas.

No entanto, parece que a migração das MSCr é dependente da presença das amostras, de forma mais evidente quando estas células estão na presença do hidrolisado total, resultante da digestão da UBM com pepsina. A migração das MSCr necessita de nova avaliação em relação aos derivados da UBM, para que estes índices de migração sejam mais precisos, contudo, os resultados, embora preliminares, sugerem a existência de um mecanismo através do qual estas células são recrutadas pelos produtos de degradação da MEC, indicando que poderão promover o recrutamento de células progenitoras depois de uma lesão num tecido *in vivo*.

Posteriormente, neste trabalho foram realizados estudos de migração utilizando um sistema diferente – *Neuro Prob chamber* AP48 – para optimização das condições do ensaio. Contudo, não são apresentados os resultados obtidos, uma vez que ainda se estão a optimizar as condições dos ensaios.

Em estudos anteriores, o efeito dos hidrolisados de UBM na migração de células progenitoras já tinha sido verificado, utilizando diferentes câmaras de migração e outros tipos de células progenitoras. Por exemplo, Reing e seus colaboradores mostraram que MRL *blastema cells* (MRL-B), tratadas com o hidrolisado de UBM (200-500 µg peso seco/mL) apresentavam uma percentagem de migração de 405% em relação ao controlo, utilizando o sistema *Neuro Prob chamber*. As *multilineage progenitor cells* (MLPCs), também estudadas, foram tratadas com 1 mg/mL do hidrolisado de UBM (peso seco) e foi verificada uma migração de 104% em relação ao controlo, utilizando câmaras de migração baseadas em fluorescência (Reing *et al.*, 2009). Agrawal e seus colaboradores, ao estudarem a migração de células estaminais perivasculares (na *Neuro Prob chamber*) na presença do hidrolisado da UBM, com concentrações que variavam entre os 0 e os 100 µL/ml, também comprovaram esta actividade quimiotática, tendo sido verificada uma maior migração para a concentração de 100 µg/ml (Agrawal *et al.*, 2010).

Ainda não está esclarecido se as concentrações de péptidos resultantes da degradação da MEC que ocorrem *in vivo* são comparáveis com as utilizadas neste e noutros estudos, e se as moléculas quimiotáticas presentes nesta mistura obtida pela digestão da UBM com pepsina, também seriam as mesmas resultantes da degradação *in vivo*, já que, as moléculas específicas responsáveis pelo efeito quimiotático ainda não foram identificadas. Para além disso, existem outros factores, como a espécie e a idade do tecido de onde a MEC foi retirada que deverão ser considerados, uma vez que, por exemplo, a quimioataxia decresce com a idade (Brennan *et al.*, 2008).

3.3 Avaliação da capacidade regenerativa dos produtos resultantes da digestão da UBM *in vivo*

Vários investigadores demonstraram que a MEC produzida por diferentes tipos de células pode servir como um *scaffold* biológico ideal e acelerar a remodelação de tecidos em vários órgãos (Badylak, 2007; Armour *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2006). Neste trabalho, os produtos da degradação da MEC foram testados em feridas na pele de ratos Balb/c para verificar a sua capacidade de regeneração e prevenção de formação de cicatriz no local da lesão. Foram realizados ensaios onde se aplicaram amostras de 2 em dois dias. Durante este período fez-se a análise macroscópica e ao oitavo e décimo oitavo dia sacrificou-se um grupo de animais para análise histológica.

A análise macroscópica das feridas dos animais foi realizada ao longo do tempo. Embora as feridas tenham sido feitas utilizando um *punch* de biopsia (3 mm de diâmetro) o tamanho das feridas nos animais não foi uniforme, nomeadamente as feridas do grupo tratado com o hidrolisado ficaram maiores. Na análise macroscópica foi possível verificar a formação de crosta em ambos os grupos, logo nos primeiros dias. A crosta do grupo tratado com o hidrolisado era maior e diferente das do grupo tratado com a fracção solúvel do hidrolisado, em que o tamanho era menor e com menos relevo. Ao oitavo dia (correspondente a 4 aplicações), as feridas apresentavam as mesmas características dos dias anteriores, contudo já estavam mais fechadas, não se verificando uma evolução macroscópica visível das feridas, principalmente nos animais tratados

com o hidrolisado, foram então administrados novamente os respectivos tratamentos em cada grupo. Ao décimo quinto dia, as feridas do grupo tratado com a fracção solúvel do hidrolisado estavam completamente fechadas, apenas se salientava algum rubor, mais ténue do que no controlo. No grupo tratado com o hidrolisado total, as feridas também se encontravam fechadas e sem crosta, embora com diâmetro maior. Dezoito dias após o início do ensaio, as feridas de ambos os grupos não eram visíveis devido ao pelo, que entretanto cresceu no local das lesões. As feridas tratadas com PBS apresentaram, ao longo dos dias, a mesma evolução dos seus respectivos grupos tratados com os derivados da UBM. Esta maior demora no fecho das feridas do grupo do tratamento do hidrolisado, poderá ter-se devido ao facto do tamanho das feridas serem maiores do que as do outro grupo, e não ao tratamento em si, já que as respectivas feridas controlo, apresentaram um tamanho idêntico. Como mais à frente será mostrado, a análise histológica mostra diferentes resultados entre as feridas do controlo e as tratadas com os derivados da UBM, indicando que o tamanho inicial das feridas, à partida, não influenciou os resultados. Na figura 3.8 é visível a evolução das feridas ao longo dos dias.

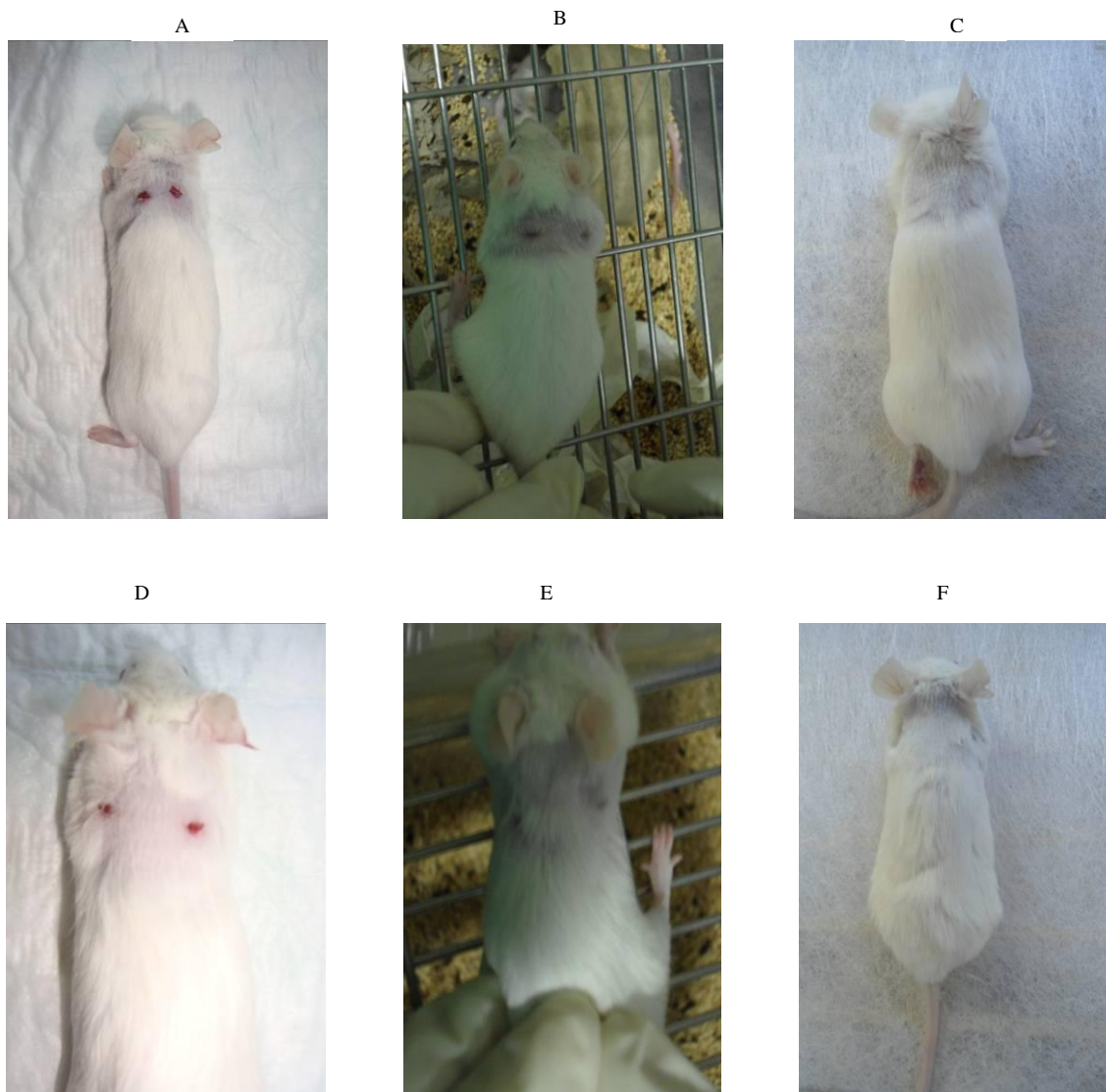


Figura 3.8 Fotografias tiradas às feridas dos animais 8 (A, D), 15 (B, E.) e 18 (C, F) dias após o início do ensaio. Os animais A, B e C pertencem ao grupo que recebeu como tratamento o hidrolisado e os animais D, E e F, ao grupo que recebeu como tratamento a fracção solúvel do hidrolisado. As feridas do lado direito do animal foram tratadas com as amostras e as do lado esquerdo receberam PBS (controlo).

A avaliação histológica revelou que, nos animais sacrificados ao oitavo dia, as feridas tratadas com o hidrolisado não apresentavam epiderme, apenas crosta. As feridas controlo deste grupo continham neutrófilos indicando infecção e apresentavam epiderme mas sem a presença de folículos e com tecido de granulação. Nas feridas do grupo tratado com a fracção solúvel do hidrolisado eram visíveis folículos, embora ainda raros. As feridas controlo deste grupo apresentavam as mesmas estruturas encontradas no controlo do outro grupo mas sem sinal de infecção.

Ao décimo oitavo dia, os dois últimos grupos de animais foram sacrificados. A análise histológica às feridas do grupo tratado com o hidrolisado foi a que apresentou uma imagem mais próxima à verificada nos tecidos normais. Continha mais queratina, apresentava maior número de glândulas sebáceas (*) e de folículos (**), do que os animais do grupo tratados com a fração solúvel do hidrolisado. Assim, ambos os grupos revelaram sinais de uma boa regeneração, mais evidente no grupo tratado com o hidrolisado. Já nas feridas tratadas com PBS foi verificada uma hiperplasia comum (***) em tecido de granulação (****), sinal de cicatrização, algumas células inflamatórias e menor número de vasos sanguíneos. As imagens da figura 3.9 mostram as imagens das histologias das feridas.

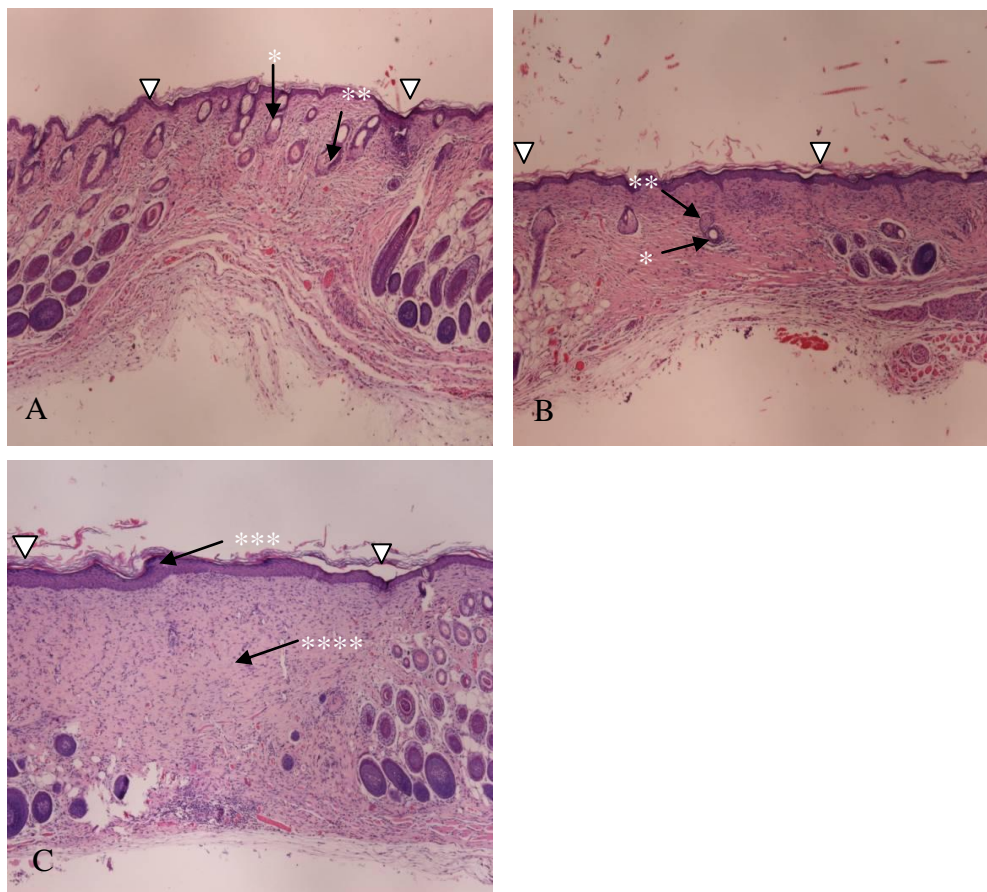


Figura 3.9 Análise histológica das feridas de ratos sacrificados ao décimo oitavo dia após o início do ensaio (ampliação 4x). Feridas tratadas com hidrolisado (A), fração solúvel do hidrolisado (B) ou PBS (C). Os limites da ferida estão indicados com a cabeça de seta branca. As feridas que receberam o hidrolisado e a fração solúvel do hidrolisado aumentaram o número de glândulas sebáceas (*) e de folículos (**) apresentando uma derme e epiderme melhor desenvolvidas do que as feridas controle, com hiperplasia comum (***) em tecido de granulação (****), onde se aplicou apenas PBS.

Neste ensaio, o centro das feridas não foi marcado, o que dificultou a recolha da amostra para a análise histológica, especialmente nos tempos mais tardios (18 dias após o início do ensaio) onde já não eram visíveis os locais das feridas macroscopicamente. É assim possível especular que o corte tenha sido efectuado na parte mais lateral e não ao centro, fazendo com que os resultados necessitem de ser confirmados. Apesar desta limitação, todas as feridas apresentaram a mesma evolução histológica e os resultados indicam que os derivados da UBM facilitam o processo de reparação, melhorando o processo regenerativo de algumas estruturas, aumentando o número de folículos e apresentando uma estrutura mais coincidente com a estrutura da derme e epiderme, reduzindo a formação da cicatriz.

3.4 Incorporação da eritropoetina no nanogel de dextrino

Os polímeros, quer sintéticos quer naturais, têm sido explorados como veículos de agentes activos, mas na maioria das vezes os sintéticos não degradáveis são os mais utilizados (Hreczuk-Hirst *et al.*, 2001). Contudo, a tolerabilidade clínica do dextrino, a sua absorção eficaz (através da degradação pela amilase) e a facilidade com que é excretado (graças ao seu baixo peso molecular) evitam a acumulação nos tecidos, sendo por isso uma boa opção como material para transporte de agentes activos (Carvalho *et al.*, 2010). Os sistemas de transporte de proteínas podem resultar em menores efeitos secundários e maior eficiência no tratamento (Reis *et al.*, 2006). Isto é especialmente verdade no caso da EPO em que, por esta via, se evita a administração sistémica, aumentando a sua biodisponibilidade, garantindo uma concentração eficaz (Bader, 2010).

Para confirmar a incorporação da EPO no NG, esta foi quantificada por ELISA, como referido no capítulo dos Materiais e métodos, depois da formação do complexo nanogel/EPO. O FBS e o NG de dextrino foram analisados e não mostraram interferência no método de quantificação utilizado nesta experiência. Também a EPO em PBS contendo 20% de FBS não alteraram os valores da densidade óptica (D.O). Os

resultados sugerem que a EPO foi incorporada no NG, mas esta incorporação não foi total nas condições utilizadas no ensaio. Neste trabalho a estratégia utilizada para separar a EPO livre (não incorporada no NG) da EPO incorporada no NG de dextrino foi a ultrafiltração, usando para isso *centricons* com MWCO de 100 kDa. Esperava-se que a proteína com 30,4 kDa passasse pela membrana e que o NG (com peso molecular superior a 100 kDa) contendo a EPO ficasse retido. Contudo, os resultados mostraram que a EPO não passa através da membrana de 100 kDa, embora o seu PM seja inferior. Este resultado poderá dever-se à glicosilação da EPO e consequente aumento do seu peso molecular, impedindo, assim, a sua ultrafiltração com a membrana de 100 kDa. Apesar desta limitação, os resultados sugerem que há incorporação de proteína no NG, bem como libertação na presença de soro. A diminuição da quantidade de EPO detectada em solução na presença do NG (diminuição de 65%) dever-se-á ao facto de diminuírem os locais de ligação ao anticorpo quando a proteína está incorporada no NG. Quando é adicionado o soro (FBS) as proteínas do soro competem com a EPO e esta fica novamente em solução ficando disponível para se ligar ao anticorpo e ser quantificada, sendo assim registada uma maior quantidade de EPO, que pode diferir menos da quantidade de EPO inicial introduzida (cerca de 13%).

Tabela 3.2 Resultados obtidos no ensaio de incorporação da EPO no nanogel de dextrino. Estão representadas as D.O. obtidas com as concentrações de EPO equivalentes.

Amostra	D.O. 450 nm	mU/ml
NG	0,073	0
EPO inicial (100 mU/ml)	1,224	100
EPO inicial <i>Flow Fraction centricon</i>	0,272	15
EPO + NG	0,510	35
EPO + NG <i>Flow Fraction centricon</i>	0,099	0
EPO + NG + 20% FBS	1,134	87

4. Conclusão e trabalhos futuros

Os resultados *in vitro* obtidos neste trabalho suportam a ideia de que as moléculas produzidas pela degradação da UBM têm um papel importante no recrutamento de MSC. As mesmas moléculas utilizadas, *in vivo*, na reparação de feridas parecem facilitar a remodelação e restauro da função da pele danificada, tendo sido verificada uma estrutura mais coincidente com a derme e epiderme dos tecidos não lesados. O efeito quimiotático dos derivados da UBM sobre as MSC *in vivo* não foi estudado, mas as diferenças histológicas verificadas entre as feridas tratadas e as controlo poderão sugerir o recrutamento deste tipo de células, já que estas são capazes de se diferenciarem em queratinócitos, células endoteliais, pericitos e sebócios. Como a contribuição da diferenciação das MSC é limitada devido ao baixo número e fraca sobrevivência destas células no local da lesão, a remodelação verificada nas feridas tratadas com os derivados da UBM poderá ter sido potenciada pelo recrutamento de MSC através do processo *homing*. Não se sabe se a degradação *in vivo* da MEC resulta no mesmo tipo de moléculas originadas no processo de degradação artificial utilizado neste trabalho, pelo que a identificação e caracterização das matriquinas deverá ser um passo importante para a compreensão do processo de regeneração de tecidos utilizando os derivados da UBM. Os resultados dos ensaios de proliferação poderão indicar a falta de factores de crescimento, assim o processo de descelularização deverá ser feito de modo a preservá-los. Os factores de crescimento revelaram, em estudos anteriores, ser importantes na proliferação celular, assim, este facto juntamente com os resultados deste trabalho, poderão indicar que a presença dos derivados da UBM, por si só, não será responsável pela proliferação celular. Assim, os factores de crescimento presentes na MEC poderão ter um papel importante na proliferação celular e os derivados da MEC na migração celular. Os resultados deste trabalho necessitam de nova verificação, mas embora preliminares sugerem que os produtos da degradação da UBM apresentam elevado potencial para regeneração de feridas, confirmando o seu papel na regeneração de tecidos já descrito em trabalhos anteriores (Badylak *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2010)

No estudo de incorporação da EPO no nanogel de dextrino, os resultados sugerem que a EPO foi incorporada, bem como libertada na presença de soro, contudo esta incorporação não foi total nas condições utilizadas no ensaio, não sendo possível separar a EPO livre da EPO incorporada no NG de dextrino por ultrafiltração, provavelmente devido à glicosilação da EPO e consequente aumento do seu peso molecular, sendo necessário ultrapassar esta limitação técnica para testar este sistema de libertação controlada da EPO eficazmente.

5. Bibliografia

- Adair-Kirk, T. L.; Senior, R. M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2008**, 40, 1101–1110.
- Agrawal, V.; Scott A. Johnson, S. A.; Reing, J.; Zhang, L.; Tottey, S.; Wang, G.; Hirschi, K. K.; Braunhut, S.; Gudas, L. J.; Badylak, S. F. Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* **2010**, 107, 3351–3355.
- Armentano, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer Degradation and Stability* **2010**, 95, 2126–2146.
- Armour, A. D.; Fish, J. S.; Woodhouse, K. A.; Semple, J. L. A comparison of human and porcine acellularized dermis: interactions with human fibroblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* **2006**, 117, 845–856.
- Bader, A. Topical application and formulation of erythropoietin for skin wound healing. *US Pat 0278916 A1* **2010**.
- Badylak S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* **2007**, 28, 3587–3593.
- Badylak, S. F.; Freytes, D. O.; Gilbert, T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia* **2009**, 5, 1–13.
- Badylak, S. F.; Kropp, B.; McPherson, T.; Liang, H.; Snyder, P. W. SIS: A rapidly resorbable bioscaffold for augmentation cystoplasty in a dog model. *Tissue Engineering* **1998**, 4, 379–387.
- Badylak S.F.; Park K.; Peppas N.; McCabe, G.; Yoder, M. Marrow-derived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix. *Exp. Hematol* **2001**, 29, 1310–1318.
- Badylak, S. F.; Tullius, R.; Kokini, K.; Shelbourne, K. D.; Klootwyk, T.; Voytik, S. L. et al. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for

- Achilles tendon repair in a dog model. *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**; 29, 977–985.
- Baldwin, S. P.; Saltzman, M. W. Materials for protein delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, 33, 71-86.
- Bellon, G.; Martiny, L.; Robinet, A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2004**, 49, 203–220.
- Bencherif, S. A.; Siegwart, D. J.; Srinivason, A.; Horkay, F.; Hollinger, J. O.; Washburn, N. R.; Matyjaszewski, K. Nanostructured hybrid hydrogels prepared by a combination of atom transfer radical polymerization and free radical polymerization. *Biomaterials* **2009**, 30, 5270-5278.
- Bowers, S. L. K.; Banerjee, I.; Baudino, T. A. The extracellular matrix: At the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2010**, 48, 474–482.
- Brennan, E. P.; Reing, J.; Chew, D.; Myers-Irvin, J. M.; Young, E. J.; Badylak, S. F. Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix. *Tissue Engineering* **2006**, 12, 2949-2955.
- Brennan, E. P.; Tang, X. H.; Stewart-Akers, A. M.; Gudas, L. J.; Badylak, S. F. Chemoattractant activity of degradation products of fetal and adult skin extracellular matrix for keratinocyte progenitor cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2008**, 2, 491–498.
- Brown, B.; Lindberg, K.; Reing, J.; Stolz, D. B.; Badylak, S. F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng* **2006**, 12, 519–526.
- Byrne, M. E.; Park, K.; Peppas, N. A. Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 149-161.
- Carvalho, V.; Castanheira, P.; Faria, T. Q.; Gonçalves, C.; Madureira, P.; Faro, C.; Domingues, L.; Brito, R. M. M.; Vilanova, M.; Gama, M. Biological activity of heterologous murine interleukin-10 and preliminary studies on the use of dextrin nanogel as a delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 400, 234-242.
- Cebotari, S.; Lichtenberg, A.; Tudorache, I.; Hilfiker, A.; Mertsching, H.; Leyh, R.; Breymann, T.; Kallenbach, K.; Maniuc, L.; Batrinac, A.; Repin, O.; Maliga, O.;

- Ciubotaru, A.; Haverich, A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* **2006**, 114, 132-137.
- Chen, F-M.; Wu, L-A.; Zhang, M.; Zhang, R.; Sun, H-H. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials* **2011**, 32, 3189-3209.
- Chen, F.; Yoo, J. J.; Atala, A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology* **1999**, 54, 407.
- Chen, R. R.; Mooney, D. J. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 1103-1112.
- Chong, Z. Z.; Kang, J. Q.; Maiese, K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, 138, 1107–1118.
- Chun, S. Y.; Lim, G. J.; Kwon, T. G.; Kwak, E. K.; Kim, B. W.; Atala, A.; Yoo, J. J. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. *Biomaterials* **2007**, 28, 4251–4256.
- Cunha, C.; Panseri, S.; Antonini, S. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration. *Biology and Medicine* **2011**, 7, 50-59.
- Dash, A. K.; Cudworth, G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **1998**, 40, 1-12.
- Davis, G. E. Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: Relationships to pattern recognition receptor regulated events. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2010**, 48, 454–460.
- Davis, G. E.; Bayless, K. J.; Davis, M. J.; Meininger, G.A. Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules. *American Journal of Pathology* **2000**, 156, 1489-1498.
- Dominici, M.; Paolucci, P.; Conte, P.; Horwitz, E. M. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation* **2009**, 87, 36–42.

- Eming, S. A.; Harmmerschmidt M.; Krieg, T.; Roers, A. Interrelation of immunity and tissue repair and regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2009**, 20, 517-527.
- Engel, E.; Michiardi, A.; Navarro, M.; Lacroix, D.; Planell, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends in Biotechnology* **2007**, 26, 39-47.
- Fliser, D.; Haller, H. Erythropoietin and treatment of non-anemic conditions-cardiovascular protection. *Semin. Hematol.* **2007**, 44, 212–217.
- Fiel, G.; Daum, L.; Amend, B.; Maurer, S.; Renninger, M.; Vaegler, M.; Seibolb, J.; Stenzl, A.; Sievert, K-D. From tissue engineering to regenerative medicine in urology – The potential and the pitfalls. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63, 375-378.
- Fisher, J. W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2003**, 228, 1–14.
- Freytes, D.O.; Badylak, S. F.; Webster, T. J.; Geddes, L. A.; Rundell, A. E. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* **2004**, 25, 2353–2361.
- Freytes, D. O.; Martin, J.; Velankar, S. S.; Lee, A. S. L.; Badylak, S. F. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials* **2008**, 29, 1630-1637.
- Gargett, C. E. Identification and characterisation of human endometrial stem/ progenitor cells. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2006**, 46, 250–253.
- Gilbert, T. W.; Stewart-Akers, A M.; Simmons-Byrd, A.; Badylak, S. F. Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine achilles tendon repair. *JBJS—Am*, **2007**; 89, 621–30.
- Gnecchi, M.; Melo, L. G. “Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, Characterization, Viral Transduction, and Production of Conditioned Medium”. *Stem Cells in Regenerative Medicine: Methods and Protocols. Humana Press* **2009**, 482, Chapter 18, 281-294. Print.
- Gonçalves, C.; Gama, F. M. Characterization of self-assembly process of hydrophobically modified dextrin. *Eur. Polym. J.* **2008**, 44.

- Gonçalves, C.; Martins, J. A.; Gama, F. M. Self-assembled nanoparticles of dextrin substituted with hexadecanethiol. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 392-398.
- Gonçalves, C.; Torrado, E.; Martins, T.; Pereira, P.; Pedrosa, J.; Gama, M. Dextrin nanoparticles: studies on the interaction with murine macrophages and blood clearance. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2009**, 75, 483-489.
- Gupta, P.; Kaviratna, V.; Sanjay, G. Hydrogels: from controlled release to pH responsive drug delivery. *Elsevier* **2002**, 7, 569-579.
- Hoare, T. R.; Kohane, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **2008**, 49, 1993-2007.
- Hocking, A. M.; Gibran, N. S. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Experimental Cell Research* **2010**, 2213-2219.
- Hodde J. P.; Ernst, D. M.; Hiles, M. C. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix. *Journal of Wound Care* **2005**, 14, 23-25.
- Hodde, J. P.; Record, R. D.; Liang, H. A.; Badylak, S. F. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium* **2001**, 8, 11-24.
- Hreczuk-Hirst, D.; Chicco, D.; German, L.; Duncan, R. Dextrin as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendent groups. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, 230, 57-66.
- Kim, B-F.; Park, I-K.; Hoshiba, T.; Jiang, H-L.; Choi, Y-J.; Akaike, T.; Cho, C-S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36, 238-268.
- Kim, S.; Kim, J. H.; Jeon, O.; Kwon, I. C.; Park, K., *Eur J Pharm Biopharm* **2009**, 71, 420- 30.
- King, V. R.; Averill, S. A.; Hewazly, D.; Priestley, J. V.; Torup, L.; Michael-Titus, A. T. Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 26, 90–100.
- Knoll, L. D. Use of porcine small intestinal submucosal graft in the surgical management of Peyronie's disease. *Urology* **2001**, 57, 753–757.

- Kopecek, J.; Yang, J. Peptide-directed self-assembly of hydrogels. *Acta Biomaterialia*, **2009**, 5, 805-816.
- Kränkel, N.; Spinetti, G.; Amadesi, S.; Madeddu, P. Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy. *Pharmacology & Therapeutics* **2011**, 129, 62–81.
- Lacombe, C.; Da Silva, J. L.; Bruneval, P.; Casadevall, N.; Camilleri, J. P.; Bariety, J.; Tambourin, P.; Varet, B.; Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. *Am. J. Kidney Dis.* **1991**, 18, 14–19.
- Li, B.; Wang, J. H-C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *Journal of Tissue Viability* **2009**, In Press.
- Li, F.; Li, W.; Johnson, S . A.;Ingram, D. A.; Yoder, M. C. Low-Molecular-Weight Peptides Derived from Extracellular Matrix as Chemoattractants for Primary Endothelial Cells. *Endothelium* **2004**, 11, 99–206.
- Li, H.; Fu, X.; Ouyang, Y.; Cai, C.; Wang, J.; Sun, T. Adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, 725–736.
- Liao, S.; Chan, C. K.; Ramakrishna, S. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering. *Materials Science and Engineering* **2008**, 28, 1189-1202.
- McDevitt, C. A.; Wildey, G. M.; Cutrone, R. M. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, 67, 637–640.
- Maienschein, J. Regenerative medicine`s historical roots in regeneration, transplantation, and translation. *Developmental Biology* **2011**. In Press.
- Maiese, K.; Chong, Z.Z. Insights into oxidative stress and potential novel therapeutic targets for Alzheimer disease. *Restor. Neurol. Neurosci.* **2004**, 22, 87–104.
- Maiese, K.; Chong, Z. Z.; Li, F.; Shang, Y. C. Erythropoietin: Elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* **2008**, 85, 194–213.
- Maquart, F. X.; Bellon, G.; Pasco, P.; Monboisse, J. C. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* **2005**, 87, 353–360.

- Maquart, F-X.; Pasco, S.; Ramont, L.; Hornebeck, W.; Monboisse, J-C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity Implication in tumor invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2004**, 49, 199–202.
- Mauney, J.; Olsen, B. R.; Volloch, V. Matrix remodeling as stem cell recruitment event: A novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix. *Matrix Biology* **2010**, 29, 657–663.
- Metcalf, A.; Ferguson, M. W. J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* **2007**, 28, 5100-5113.
- Mikati, M. A.; Hokayem, J. A.; Sabban, M. E. Effects of a single dose of erythropoietin on subsequent seizure susceptibility in rats exposed to acute hypoxia at p10. *Epilepsia* **2007**, 48, 175–181.
- Mitsiadis, T. A.; Barrandon, O.; Rochat, A.; Barrandon, Y.; Bari, C.D. Stem cell niches in mammals. *Experimental Cell Research* **2007**, 313, 3377 – 3385.
- Moon, C.; Krawczyk, M.; Paik, D.; Coleman, T.; Brines, M.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J.; Lakatta, E. G.; Talan, M. I. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 316, 999-1005.
- Motornov, M.; Roiter, Y.; Tokarev, I.; Minko, S. Stimuli-responsive nanoparticles and capsules of integrated multifunctional intelligent systems. *Progress in Polymer Science* **2010**, 35, 174-211.
- Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 762-798.
- Palatinus, J. A.; Rhett, J. M.; Gourdie, R. G. Translational lessons from scarless healing of cutaneous wounds and regenerative repair of the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2010**, 48, 550-557.
- Polak, D. J. M. Regenerative medicine: A primer for pediatricians. *Early Human Development* **2009**, 85, 685-689.
- Quaglia, F. Bioinspired tissue engineering: The Great promise of protein delivery Technologies. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 364, 281-297.

- Reing, J. E.; Zhang, L.; Irvin, J. M.; Kevin E; Cordero, K. E.; Freytes, D. O.; Katz, E. H.; Bedelbaeva, K.; McIntosh, D.; Dewilde, A.; Braunhut, S. J.; Badylak, S. F. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and poliferation. *Tissue Engineering*, **2009**, 15, 605-614.
- Reis, C. P.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2006**, 2, 53-65.
- Reis, R. L.; Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Baran, E. T.; Drug delivery therapies I – General trends and its importance on bone tissue engineering applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2002**, 6, 283-295.
- Rickey, F. A.; Elmore, D.; Hillegonds, D.; Badylak, S. F.; Record, R.; Simmons- Byrd, A. Re-generation of tissue about an animal-based scaffold: AMS studies of the fate of the scaffold. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* **2000**, 172, 904–909.
- Rieux, A.; Fievez, V.; Garinot, M.; Schneider, Y. J.; Préat, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release* **2006**, 116, 1-27.
- Sasaki, M.; Abe, R.; Fuita, Y.; Ando, S.; Inokuma, D.; Shimizu, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* **2008**, 180, 2581–2587.
- Schenk, S.; Quaranta, V. Tales from the crypt(ic) sites of the extracellular matrix. *Trends in Cell Biology* **2003**, 13, 366-375.
- Schor, S. L.; Ellis, I.; Banyard, J.; Schor, A. M. Motogenic activity of IGD-containing synthetic peptides. *J Cell Sci* **1999**, 112, 3879–88.
- Schreml, S.; Szeimies, R-M; Prantl, L.; Landthaler, M.; Babilas, P. Wound healing in the 21st century. *J. American Academy of Dermatology* **2009**, 63, 866-881.
- Shekaran, A.; Garcia, A. J. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* **2011**, 1810, 350-360.
- Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M. M.; Barbosa, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and

- 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, 59, 491-500.
- Vacanti, J. Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *Journal of Pediatric Surgery* **2010**, 45, 291-294.
- Verdonck, O.; Lahrech, H.; Francony, G.; Carle, O.; Farion, R.; Van de Looij, Y.; Remy, C.; Segebarth, C.; Payen, J. F. Erythropoietin protects from post-traumatic edema in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, 27, 1369–1376.
- Vorotnikova, E.; McIntosh, D.; Dewilde, A.; Zhang, J.; Reing, J. E.; Zhang, L.; Cordero, K.; Bedelbaeva, K.; Gourevitch, D.; Heber-Katz, E.; Badylak, S. F.; J. Braunhut, S. J. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biology* **2010**, 29, 690–700.
- Voytik-Harbin, S. L.; Brightman, A. O.; Kraine, M. R.; Waisner, B.; Badylak, S. F. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *Journal of Cellular Biochemistry* **1997**, 67, 478–491.
- Wu, Y.; Chen, L.; Scott, P. G.; Tredget, E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* **2007**, 25, 2648–2659.
- Yang, J.; Yamoto, M.; Kohno, C.; Nishimoto, A.; Sekine, H.; Fukai, F.; Okano, T. Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **2005**, 26, 6415-6422.
- Yi, M.; Ruoslahti, E. A. Fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98, 620–624.
- Zwezdaryk, K. J.; Coffelt, S. B.; Figueroa, Y. G.; Liu, J.; Phinney, D. G.; Heather L. LaMarca, H. L.; Florez, L.; Morris, C. B.; Hoyle, G. W.; Scandurro, A. B. Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* **2007**, 35, 640–652.